

Aufnahme, Stoffwechsel und
Biosynthese einiger aromatischer
Säuren in höheren Pflanzen

von

GISELA MÜLLER

München 1964

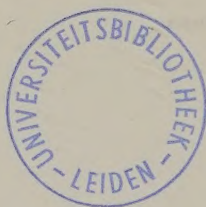
1965

Aufnahme, Stoffwechsel und Biosynthese einiger
aromatischer Säuren in höheren Pflanzen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Gisela Müller
aus
Reutlingen

Mai 1964



1. Berichterstatter: Prof.Dr.L.Brauner
2. Berichterstatter: Prof.Dr.H.Merxmüller

Tag der mündlichen Prüfung: 27.1.1965

Inhaltsverzeichnis

=====

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL und METHODEN	3
1. Pflanzenmaterial	3
2. Inkubation und Aufarbeitung des Pflanzenma- terials	
a) Untersuchungen der Aufnahme der aromati- schen Säuren und ihres Stoffwechsels ...	4
b) Untersuchungen der Biosynthese der Benzoessäuren	5
3. Bestimmung der IES-Peroxydase in vivo und in vitro	8
4. Messung der Radioaktivität	10
5. Chemikalien und Isotopen	11
III. ERGEBNISSE	12
A. <u>Aufnahme von Benzoessäure, 2,4-Dichlorphenoxy- essigsäure und Indol-3-essigsäure</u>	12
1. Der Einfluß des pH-Wertes auf die Aufnahme der Säuren	14
2. Der zeitliche Verlauf der Aufnahme der Säuren	16
3. Der Einfluß der Temperatur auf die Aufnahme der Säuren	17
4. Der Einfluß der Konzentration auf die Auf- nahme der angebotenen Säuren	18
5. Der Einfluß analoger Säuren und Hemmstoffe auf die Aufnahme der Säuren	19
6. Der Einfluß der Verarmungsdauer auf die Aufnahme der Indol-3-essigsäure durch de- kapitierte Helianthus-Hypokotyle	21

B. <u>Stoffwechsel von Benzoesäure, 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und Indol-3-essigsäure</u>	22
1. Die Stoffwechselprodukte der Benzoesäure	22
1.1. Trennung des Glucose-1-benzoates von Glucose-6-benzoat durch selektive Hydrolyse	24
1.2. Getrennte Bestimmung von Glucose-1-benzoat und Glucose-6-benzoat durch Umsetzung mit Hydroxylamin	28
1.3. Chemischer Abbau des aus Vaccinium vitis-idaea isolierten Glucosebenzoates.	29
1.4. Enzymatische Synthese des Glucose-1-benzoates	32
2. Die Stoffwechselprodukte der 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	34
3. Die Stoffwechselprodukte der Indol-3-essigsäure	38
3.1. Nachweis proteingebundener Indol-3-essigsäure	39
3.2. Oxydative Zerstörung von außen dargebotener Indol-3-essigsäure und der Einfluß verschiedener Phenolcarbonsäuren auf diesen Abbau	43
3.3. Über den Einfluß der Wundflächen auf die enzymatische Oxydation der Indol-3-essigsäure	52
C. <u>Biosynthese von p-Hydroxybenzoesäure und anderer Benzoesäuren in der höheren Pflanze</u>	58
1. Einbau verschiedener möglicher Vorläufer in die p-Hydroxybenzoesäure	60
2. Kinetische Untersuchungen über die Einlagerung und Umwandlung von Phenylalanin in Catalpa bignonioides-Blättern	63
3. Einbau von Phenylalanin in weitere Benzoesäuren	69
IV. DISKUSSION	71
V. ZUSAMMENFASSUNG	82
VI. LITERATURVERZEICHNIS	85

I. EINLEITUNG

=====

Die aromatischen Säuren stellen für die höhere Pflanze eine wichtige Stoffgruppe dar. So werden das pflanzliche Streckungswachstum und manche anderen entwicklungsphysiologischen Prozesse durch eine Reihe natürlicher und synthetischer Hormone, die die Struktur einfacher aromatischer Säuren besitzen, beeinflusst. Auch die Vorstufen des Lignins, der pflanzlichen Stützsubstanz, sind relativ einfache Phenolcarbonsäuren. Daneben existiert noch eine große Anzahl aromatischer Säuren, die als Glucoside in den Vakuolen der Zelle abgelagert werden, oder aber als Ester in ätherischen Ölen vorliegen können. Über die Funktion dieser "sekundären Pflanzenstoffe" ist jedoch noch wenig bekannt.

Trotz der Wichtigkeit und der Vielzahl der Verbindungen sind an Vertretern dieser Stoffgruppe bisher kaum Untersuchungen über ihre Aufnahme in die Zelle, den Stoffwechsel, den sie in der Zelle erfahren, oder ihre Biosynthese angestellt worden.

Einige Arbeiten über die Aufnahme von Wuchsstoffen durch pflanzliches Gewebe liegen zwar vor (SUTTER, 1944; REINHOLD, 1954; JOHNSON und BONNER, 1956; BLACKMAN et al. 1959), sie wurden jedoch nicht zur Erforschung allgemeiner Aufnahmecharakteristiken, sondern mehr zum Studium des Wuchsstoffmechanismus unternommen. Vor allem für die Aufklärung der Naturstoffbiosynthesen, bei denen aromatische Säuren die Vorstufe bilden, liegen bisher kaum Angaben vor, die etwas über den Einfluß des Milieus bei der Aufnahme dieser Säuren aussagen. In der vorliegenden Arbeit sollen daher Versuche beschrieben werden, in denen die Aufnahme von 3 Säuren, der Benzoessäure (BzS), 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) und Indol-3-essigsäure (IES), in Abhängigkeit von verschiedenen Aussenfaktoren studiert wurde.

Über den Stoffwechsel der genannten Auxine und der BzS in höheren Pflanzen liegen im wesentlichen nur Angaben aus dem Arbeitskreis von ANDREAE vor (ANDREAE und van YSSELSTEIN, 1956, 1960; ANDREAE und GOOD, 1955, 1957). Als Stoffwechselprodukte dieser Säuren wurden die entsprechenden Asparaginsäurederivate und Säureamide gefunden. Diese Untersuchungen wurden mit besserer Methodik unter Einbeziehung von ^{14}C markierten Substanzen erweitert, besonders unter Berücksichtigung neuer Konjugationsprodukte zwischen Säuren und Zellbestandteilen.

Besondere Beachtung sollte deshalb eine seit mehreren Jahren postulierte Verbindung zwischen Protein und Wuchsstoff finden. Von diesem Komplex vermutet man (vgl. AUDUS, 1959), daß er die katalytische Funktion in den wachstumsauslösenden Prozessen übernimmt.

Auch der Stoffwechsel der BzS, die den einfachsten Typ einer aromatischen Säure darstellt, war Gegenstand einer genaueren Untersuchung.

Im Fall der IES wurde außerdem versucht Aufschluß über den vieldiskutierten (vgl. VENDRIG und BUFFEL, 1961, 1962; THIMANN et al. 1962) enzymatischen Abbau dieser Verbindungen in vivo zu erhalten, sowie über den Einfluß von Wundflächen auf die enzymatische Oxydation des Hetero-Auxins. Diese Experimente sind erst jetzt mit Hilfe carboxylmarkierter IES möglich geworden.

Der Schlußteil dieser Untersuchungen ist der Betrachtung der Biosynthese einfacher aromatischer Carbonsäuren, wie der Benzoessäure und weiterer hydroxylierter Benzoessäuren gewidmet. Es erschienen, während diese Versuche noch liefen, Arbeiten von GROSS und SCHÜTTE (1963) und von GRISEBACH und VOLLMER (1963). In ihnen wird die Bildung der aromatischen Carbonsäuren aus Phenylpropanen diskutiert; die Frage nach dem Einsetzen der Hydroxylierung, sei es auf der Stufe der Zimtsäure oder erst der Benzoessäure, konnte jedoch von den

Autoren nicht entschieden werden und soll hier besonders untersucht werden.

II. MATERIAL und METHODEN

=====

1. Pflanzenmaterial.

Neben einigen Freilandpflanzen aus dem Münchner Botanischen Garten, wie *Spinacia sativa*, *Vaccinium vitis-idaea*, *Catalpa ovata*, *C. bignonioides*, *Populus tremula*, *Gaultheria procumbens* und *Tsuga canadensis*, wurde vor allem *Avena sativa* als Versuchsobjekt verwendet.

Siegshafer I wurde dazu in Sägemehl ausgesät und bei 25°C in einer feuchten Kammer gehalten. Die Koleoptilen blieben ständig im Dunkeln, lediglich beim täglichen Öffnen der Kammer erhielten sie für einige Sekunden Rotlicht; dies reicht zur Unterdrückung des Mesokotylwachstums aus. Nach 4-5 Tagen hatten die Keimlinge eine Länge von 2-3 cm erreicht. 2 mm unter der Spitze wurden sie dekapitiert und aus dem darunterliegenden Abschnitt für die Versuche mit 2,4-D zwei 5 mm lange Segmente mit Primärblatt verwendet. Die Untersuchungen über die IES-Peroxydase wurden nach Dekapitierung der Koleoptilen an 3,3 mm langen Segmenten ohne Primärblatt durchgeführt.

In gleicher Weise wurden Erbsen (*Pisum sativum* var. Rondo) nach 8-stündigem Vorquellen in Sägemehl herangezogen. Nach 7 Tagen wurde die Plumula entfernt und 1 cm lange Epikotyl-segmente für die Versuche verwendet.

Für die Experimente mit IES wurden Sonnenblumen-Keimlinge verwendet. *Helianthus annuus*-Samen wurden in Petrischalen auf feuchtem Filtrierpapier ausgelegt, im Thermostaten bei 27°C innerhalb von 24 Std. zum Auskeimen gebracht und anschließend in gesiebte Gartenerde eingepflanzt. Nach einem

Aufenthalt von 6-7 Tagen in der Lichtkammer unter konstantem Licht-Dunkel-Wechsel von 14/10 Std. bei 70 % Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 20-22°C konnten die Keimlinge für die Versuche verwendet werden (vgl. BRAUNER und HAGER, 1958).

Für die Experimente mit Wuchsstoff-verarmten Helianthus-Hypokotylen wurden diese Pflanzen dicht unterhalb der Basis der Kotyledonen dekapitiert und verschieden lang in einer dunklen Kammer bei 20°C und 80 % Feuchtigkeit belassen.

Linsen (*Lens culinaris*) wurden nach 24-stündigem Vorquellen auf feuchtes Papier im Brutschrank bei 25°C ausgelegt. Für die Versuche kamen in der Regel 3 Tage alte Keimlinge zur Verwendung.

2. Inkubation und Aufarbeitung des Pflanzenmaterials.

a) Untersuchungen der Aufnahme der Säuren und ihres Stoffwechsels.

Für die Versuche wurden jeweils 250 ± 2 mg Pflanzengewebe in 6,25 ml einer 10^{-4} m Benzoesäure-(7- ^{14}C)-, 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-(1- ^{14}C)-, oder Indol-3-essigsäure-(1- ^{14}C)-Lösung in 50 ml Erlenmeyerkölbchen verschieden lange Zeiten im Dunkeln auf der Schüttelmaschine bei 21°C inkubiert. Jede Probe enthielt 0,625 ml 10^{-1} m Citrat-Phosphatpuffer. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Lösung abgegossen, das Gewebe mit kaltem Wasser abgespült und in 12,5 ml heißem 80 % Äthanol 10 Minuten am Rücklaufkondensator extrahiert. Der Extrakt wurde in Meßkölbchen eingefüllt, das Gewebe 10 Minuten nachextrahiert und die vereinigten Extrakte auf 25 ml aufgefüllt. Proben von 50 oder 100 μl wurden auf Aluminiumplättchen pipettiert und auf ihre Radioaktivität untersucht.

Anschließend wurden die Extrakte im warmen Luftstrom eingedampft, auf Chromatographiepapier (Schleicher und Schüll 2043b oder Whatmann Nr. 1 und Nr. 3) aufgetragen und in folgenden Lösungsmitteln aufsteigend entwickelt:

1. Isopropanol : Benzin (100-140°C) : H₂O = 5,5:3:1,1
2. Isopropanol : Ameisensäure : H₂O = 10:1:2
3. Isopropanol : H₂O = 8:2
4. Isopropanol : Ammoniak : H₂O = 8:1:1
5. Butanol gesättigt mit 0,5 n NH₄HPO₄ : Glykol = 9:1
6. Butanol : Eisessig : H₂O : Glykol = 5:1:2,2:0,82

Die Autoradiogramme wurden auf Agfa-Röntgenfilmen aufgenommen und nach 4-6 monatiger Expositionszeit entwickelt und ausgezählt. Durch Abeluieren und Rechromatographieren in verschiedenen Lösungsmitteln konnten die Stoffwechselprodukte rein isoliert und durch anschließende saure oder alkalische Hydrolyse identifiziert werden.

b) Untersuchungen der Biosynthese der Benzoesäuren.

Die Untersuchungen zur Klärung der Biosynthese der p-Hydroxybenzoesäure in höheren Pflanzen wurde an *Catalpa ovata* und *C. bignonioides* durchgeführt. Das Pflanzenmaterial wurde größtenteils nach Angaben von IBRAHIM und TOWERS (1960) gewählt, die das Vorkommen der betreffenden Benzoesäuren in den erwähnten Pflanzenarten beschrieben haben. Als Vorstufe wurde Phenylalanin verwendet.

Die Untersuchungen über den zeitlichen Verlauf der Biosynthese wurden mit jungen Blättern von *Catalpa ovata* während der Vegetationsperioden 1962 und 1963 durchgeführt. Jeweils 2 g $\pm$ 5 mg ausgestanzte Blattstücke (1,1 cm Durchmesser) wurden in 25 ml einer 10^{-4} m D,L-Phenylalanin-(3-¹⁴C)-Lösung, die 2,5 ml 10^{-1} m Citrat-Phosphatpuffer pH 5,3 enthielt, im Dunkeln unter leichtem Schütteln bei 21°C inkubiert. Nach den entsprechenden Zeiten wurde das Gewebe zweimal mit 80 % Äthanol am Rücklaufkondensator extrahiert und der äthanolische Auszug auf ein be-

stimmtes Volumen gebracht. Nach der Bestimmung der Gesamtaktivität wurde der Auszug eingedampft und mit 3 n NaOH bei Raumtemperatur 3 Std. hydrolysiert, um die Säure aus der Esterbindung frei zu setzen. Nach Ansäuern mit H_3PO_4 und anschliessendem 5-stündigen kontinuierlichen Ausäthern wurde mit gesättigter Bicarbonatlösung rückextrahiert, abermals angesäuert, und die Wasserphase weitere 5 Std. ausgeäthert. Der Äther wurde abgedampft, der Rückstand mit Äthanol auf ein bestimmtes Volumen gebracht und die Gesamtaktivität der Säurefraktion bestimmt.

Zur Herstellung von Autoradiogrammen wurde jeweils ein Teil des Extraktes auf Schleicher-Schüll-Papier 2043b aufgetragen und in folgenden Lösungsmitteln entwickelt: 1. Dimension: Isopropanol : NH_3 : H_2O = 8:1:1, 2. Dimension: 2 % Essigsäure. Die restlichen Extrakte wurden zur Reinigung auf Kieselgel G-Na-Molybdat-Platten (vgl. STAHL, 1962) im Fließmittel Benzol : Dioxan : Eisessig (90:25:4; p-Hydroxybenzoesäure Rf 0,55) und anschließend noch zweimal auf Papier (S. u.S. 2043b) in 2 % Essigsäure (p-Hydroxybenzoesäure Rf 0,63) chromatographiert. Nach Abeluieren der Zone mit H_2O wurde die Konzentration der p-Hydroxybenzoesäure an einem Aliquot mit Hilfe des Folin-Cialteau-Reagens spektrophotometrisch ermittelt und gleichzeitig die Radioaktivität in unendlich dünner Schicht bestimmt (spezifische Aktivität = ipm/mMol).

In gleicher Weise wurden 2 g Blattgewebe von *Catalpa bignonioides* in folgenden Lösungen 24 Std. lang inkubiert: 10^{-4} m Glucose-(2- ^{14}C), 10^{-4} m D,L-Phenylalanin-(3- ^{14}C), 10^{-4} m D,L-Tyrosin-(3- ^{14}C), 10^{-4} m Benzoessäure-(7- ^{14}C) sowie $4 \cdot 10^{-4}$ m p-Cumarsäure-(3- ^{14}C); das Gesamtvolumen betrug in jedem Fall 25,0 ml; die Pufferkonzentration (Citrat-Phosphatpuffer pH 5,3) war 10^{-2} m.

Zur Ermittlung des Biosyntheseweges der Benzoe-, Protocatechu- und Vanillinsäure wurden in Parallelversuchen jeweils 2 g Blattgewebe von *Tsuga canadensis*, *Vaccinium vitis-idaea* und *Populus tremula* in 25 ml einer 10^{-4} m D,L-Phenylalanin-(3- ^{14}C)-

Lösung (pH 5,3) wie oben beschrieben inkubiert. Die Alkohol-extraktion des Gewebes und die anschließende alkalische Hydrolyse erfolgten in der oben beschriebenen Weise. Zur Herstellung der Autoradiogramme wurde diesmal ein Teil der Säurefraktion auf Whatmann Nr. 1-Papier aufgetragen und absteigend in folgenden Gemischen chromatographiert:

1. Dimension: Benzol : Eisessig : H_2O = 6:7:3 (obere Phase),
2. Dimension: Na-Formiat : Ameisensäure : H_2O = 10:1:200.

Die Chromatogramme wurden nach 50-tägiger Exposition auf Röntgenfilmen mit dem Großflächenzählrohr ausgemessen. Zur Isolierung der verschiedenen Phenolcarbonsäuren fügte man jeder Säurefraktion genauestens 3 mg inaktive Träger-Benzoesäure, -Protocatechusäure, -Vanillinsäure und -Syringasäure zu und trennte auf Kieselgel G-Na-Molybdat-Platten in Benzol : Dioxan : Eisessig (90:25:4) vor. Die Rf-Werte betrugen für Protocatechusäure Rf 0,32, für Vanillinsäure Rf 0,54, für Syringasäure Rf 0,53 und für Benzoessäure Rf 0,69. Auf S.u.S. 2043b-Papier wurde in 2 % Essigsäure Protocatechusäure (Rf 0,30) von Kaffeesäure (Rf 0,60) getrennt und anschließend auf Kieselgel-G-Platten in Chloroform : Äthylacetat : Ameisensäure (50:40:10, Rf 0,47) nochmals gereinigt. Vanillin- und Syringasäure wurden auf Kieselgel G-Platten in Isopropanol : Methylacetat : NH_3 (35:45:20, Vanillinsäure Rf 0,15, Syringasäure Rf 0,0) und anschließend in H_2O -gesättigtem Butyläther : Eisessig (91:9; Vanillinsäure Rf 0,40, Syringasäure Rf 0,25) gereinigt, während Benzoessäure erst auf G-Platten im letztgenannten Lösungsmittel von Zimtsäure abgetrennt wurde, und dann nach Papierchromatographie auf S.u.S. 2043b in 2 % Essigsäure (Rf 0,73) in reiner Form isoliert werden konnte. Daß sich ein Umkristallisieren der auf diese Weise chromatographisch gereinigten Säuren erübrigte, zeigt der folgende Versuch. 10 μM p-Hydroxybenzoessäure, aus Catalpa nach Phenylalanin-(3- ^{14}C)-Fütterung isoliert, wurden mit 150 μM inaktiver Säure verdünnt und 4 mal mit Wasser umkristallisiert. Es ergaben sich folgende spezifische Aktivitäten : Ausgangsaktivität: $1,70 \cdot 10^5$; (1 $\times$ umkristallisiert) $1,68 \cdot 10^5$; (2 $\times$) $1,74 \cdot 10^5$; (4 $\times$) $1,79 \cdot 10^5$; ipm/mMol.

Die Bestimmung der Konzentration erfolgte bei der Benzoesäure gravimetrisch, bei Protocatechusäure, Vanillinsäure und Syringasäure photometrisch mit dem Folin-Cialteau-Reagenz. Gleichzeitig wurde die Radioaktivität eines Aliquots der betreffenden gereinigten Säuren bestimmt; dabei ergab sich eine 90-100 %ige Übereinstimmung zwischen den aus der Trägermethode ermittelten und den aus den Chromatogrammen errechneten Gesamtaktivitäten der einzelnen Phenolcarbonsäuren. Da nur die L-Formen der aromatischen Aminosäuren von den entsprechenden Enzymen desaminiert werden, die D-Formen dagegen in höheren Pflanzen zwar metabolisch aufgenommen, aber nicht oder kaum razemisiert werden können (McCALLA und NEISH, 1959; ZENK und SCHERF, 1963), wurde der Aufnahmewert zur Berechnung der Einbaurrate halbiert. Bei *Catalpa* jedoch erübrigte sich wegen des hohen Gehalts an p-Hydroxybenzoesäure und p-Cumarsäure im Blattgewebe ein Zusatz inaktiver Trägersubstanz. Der Nachweis der Phenolcarbonsäuren auf den Chromatogrammen erfolgte durch Sprühen mit diazotierter Sulfanilsäure.

Zur Bestimmung der Radioaktivität des C_7 -Atoms der Denzoesäuren wurden die Säuren auf folgende Weise thermisch decarboxyliert: 100 μ M der betreffenden in Äthanol gelösten Säure wurde in einem Spitzkölbchen zusammen mit 40 mg Kupferchromit zur Trockene eingedampft. Das Kölbchen wurde danach an eine Verbrennungsapparatur nach STUTZ und BURRIS (1951) angeschlossen, ein langsamer N_2 -Strom durch die Apparatur geleitet und die Temperatur vorsichtig (BROWN et al. 1960) auf 270°C gebracht. Das CO_2 wurde in $Ba(OH)_2$ absorbiert, die Radioaktivität des $BaCO_3$ gemessen und auf "unendlich dünne" Schicht korrigiert. Die Ausbeute an CO_2 betrug durchschnittlich 70 %.

Die Bestimmung von Phenylalanin-desaminase und Tyrase erfolgte nach NEISH (1961), wobei das Acetonpulver aus jungen Blättern von *Catalpa ovata* bereitet wurde.

p-Cumarsäure-(3- ^{14}C) wurde enzymatisch aus Tyrosin-(3- ^{14}C) mittels Tyrase nach NEISH (1961) dargestellt.

3. Bestimmung der IES-Peroxydase in vivo und in vitro.

Für die Bestimmung der IES-Peroxydase in vivo wurden 3,3 mm lange Avena-Koleoptilsegmente ohne Primärblatt verwendet. $1\text{ g} \pm 2\text{ mg}$ dieser Segmente wurden in 12,5 ml einer 10^{-5} m IES-(1- ^{14}C)-Lösung ($0,25\text{ }\mu\text{c}$), die 1,25 ml 10^{-1} m Citrat-Phosphatpuffer (pH-Anfangswert 5,0; nach 12 Std. pH 5,20) und 1,25 ml der entsprechenden 10^{-3} m Phenolcarbonsäure enthielt, inkubiert.

In 50 ml Erlenmeyerkölbchen wurden die Proben in einer umgebauten Warburg-Apparatur im Dunkeln bei 21°C leicht geschüttelt. In die Inkubationsgefäße wurde CO_2 -freie Luft eingeleitet und das ausströmende Gasgemisch in ein Zentrifugenglas mit 11 % KOH und aufgesetzter Vingreux-Säule, nach STUTZ und BURRIS (1951), geleitet. Bei dieser Anordnung wird die KOH-Lösung in die Säule gepreßt und dadurch das CO_2 des ausströmenden Gases quantitativ als K_2CO_3 gebunden. Durch Zufügen von 12 % BaCl_2 kann das CO_2 als BaCO_3 isoliert werden.

Nach 12-stündiger Inkubation wurden die Avena-Koleoptilen auf die bereits beschriebene Weise mit heißem 80 % Äthanol extrahiert und die Gesamtaktivität der aufgenommenen nicht oxydierten IES bestimmt. Die Radioaktivität der Inkubationslösung nach 12 Std. wurde ebenfalls bestimmt; dabei ergab die Summe der Impulse aus Decarboxylierung, Aufnahme und Inkubationsrückstand $96 \pm 3\%$ der angebotenen Impulse.

Die Untersuchungen über den Einfluß der Wundflächen auf die IES-Peroxydase in vivo wurden an Helianthus-Hypokotylen durchgeführt. $1\text{ g} \pm 2\text{ mg}$ dieses Gewebes wurden 6 Std. in 12,5 ml 10^{-5} m IES-(1- ^{14}C)-Lösung pH 4,4 inkubiert, und alle 2 Std. wurde das entstandene CO_2 als BaCO_3 isoliert.

Die IES-Peroxydase selbst wurde nach RABIN und KLEIN (1957) aus Erbsen gewonnen. Erbsen-Epikotyle wurden 4-6 Std. tiefgekühlt (-15°C) und anschließend im Mörser bei 0°C zerrieben, durch ein Tuch gepreßt, und das Homogenat 25 Minuten bei $12\ 000 \times g$

abzentrifugiert. Den Überstand brachte man mit eiskaltem Aceton auf eine Konzentration von 40 % und zentrifugierte bei $600 \times g$ 5 Minuten ab. Das Präcipitat wurde mit 10^{-2} m Phosphatpuffer pH 5,6 aufgenommen, durch nochmaliges Abzentrifugieren vom unlöslichen Rückstand abgetrennt und 12 Std. bei 0°C dialysiert. 1 ml Enzymlösung entsprach 4 g Frischgewicht und enthielt 7 mg Protein.

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Beckmann-Spektralphotometer nach der Trichloressigsäure-Methode von KUNITZ (vgl. LAYNE, 1957).

Das Reaktionsgemisch enthielt 0,5 ml Enzymlösung, 0,15 μ M IES und 0,01 μ M der entsprechenden Phenolcarbonsäure, das Gesamtvolumen betrug 1,0 ml. Nach 1-stündiger Inkubation bei 30°C wurde die nicht oxydierte IES mit dem Salkowski-Reagenz (TANG und BONNER, 1947) nach Abzentrifugieren des denaturierten Proteins spektralphotometrisch bestimmt.

4. Messung der Radioaktivität.

Zur Bestimmung der Radioaktivität standen Strahlungsmeßgeräte der Fa. Frieske und Hoepfner zur Verfügung. Die Extrakte wurden mit 50 oder 100 μ l Pipetten auf fettfreie Aluminiumplättchen aufgetragen, die, um das Abfließen der Extrakte zu verhindern, mit einem zentrierten Silikonfettring versehen waren. Unter Vermeidung lokaler Überhitzung wurden die Proben unter einer Infrarot-Lampe eingedampft und anschließend im Methandurchflußzähler FH 51 in "unendlich dünner" Schicht gezählt.

Chromatogramme wurden mit einem Papierchromatographen FH 452, an den ein Linienschreiber angeschlossen war, ausgewertet. Die prozentuale Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Komponenten wurde dann mit dem Endfensterzählrohr FH 15 und dem Großflächenzählrohr FH 407A ausgemessen. Diese Methode fand auch bei der quantitativen Auswertung der Autoradiogramme Verwendung.

Die Verrechnung der so gewonnenen Prozentwerte mit der Aktivität des Gesamtextraktes bei bekannter spezifischer Aktivität der Ausgangssubstanz ermöglichte die Berechnung der Konzentration der Metabolite.

Das bei den Versuchen der IES-(1- ^{14}C) Decarboxylierung entstandene $^{14}\text{CO}_2$ wurde gemeinsam mit dem Atmungs- CO_2 des Pflanzengewebes in 11 % KOH aufgefangen und mit 12 % BaCl_2 als BaCO_3 gefällt. Trägercarbonat mußte nur in wenigen Versuchen zugesetzt werden. Auf gesinterte Porzellanplanschetten (Durchmesser 1,6 cm) wurde das gesamte BaCO_3 abgenutscht, die Proben vorsichtig unter der Infrarot-Lampe getrocknet, anschließend gewogen und nach dem Messen im Methandurchflußzähler auf "unendlich dünne" Schicht korrigiert (vgl. ARONOFF, 1957).

Um einen Vergleich der auf den Plättchen gemessenen Aktivitäten mit denen des Carbonats zu ermöglichen, wurde ein Umrechnungsfaktor: Carbonat-Impulse $\times 2,15$ = Plättchen-Impulse empirisch ermittelt.

5. Chemikalien und Isotopen.

Die kommerziell bezogenen Chemikalien waren vom höchst möglichen Reinheitsgrad.

Glucose-1-benzoat wurde nach ZERVAS (1931) durch katalytische Hydrierung von 1-Benzoyl-4,6-Benzyliden- β -D-Glucose dargestellt. Glucose-6-benzoat wurde nach der Vorschrift von ZINNER et al. (1957) gewonnen und kristallisierte nach mehrmonatiger Aufbewahrung im Eisschrank.

2,4-Dichlorphenoxyacetyl-L-Asparaginsäure und Benzoyl-L-Asparaginsäure wurden über die Schotten-Baumann-Reaktion unter Verwendung der entsprechenden Säurechloride und L-Asparaginsäure synthetisiert und waren chromatographisch rein.

An Isotopen wurden verwendet:

Benzoessäure-(7-¹⁴C) (BzS) spez. Aktivität: 2,54 µc/µM,
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-(1-¹⁴C) (2,4-D) spez. Aktivität:
14 µc/µM, Indol-3-essigsäure-(1-¹⁴C) (IES) spez. Aktivität:
3,4 µc/µM, Glucose-(2-¹⁴C) spez. Aktivität: 2,31 µc/µM, D,L-
Phenylalanin-(3-¹⁴C) spez. Aktivität: 2,5 µc/µM, D,L-Tyrosin-
(3-¹⁴C) spez. Aktivität: 6,85 µc/µM. Die Reinheit der ver-
wendeten Isotopen wurde papierchromatographisch überprüft.

III. E R G E B N I S S E

=====

A) Aufnahme von Benzoessäure, 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und Indol-3-essigsäure.

Die Aufnahme aromatischer Säuren aus Lösungen durch Pflanzen-
gewebe wurde bisher lediglich an Wuchsstoffen untersucht. Ob-
gleich die Forschungen der letzten 15 Jahre sich sehr inten-
siv mit den physiologischen Aspekten der Auxine beschäftigten,
bemühte man sich nur in geringem Maße um die Klärung der die
Aufnahme kontrollierenden Faktoren. So konnte REINHOLD (1954)
sich in ihrer Arbeit über die Indol-3-essigsäure-Aufnahme
durch Erbsen-Epikotyle und Karottenscheiben lediglich auf
3 Arbeiten beziehen.

Die Annahme von SUTTER (1944), daß es sich bei der Wuchsstoff-
aufnahme nur um einen reinen Diffusionsprozess handelt, wurde
von JOHNSON und BONNER (1956) in Übereinstimmung mit den Ergeb-
nissen von REINHOLD (1954) erweitert. Es läßt sich die Aufnahme
der Auxine in zwei voneinander unabhängige Phasen zerlegen:
erstens in die Diffusion in das Gewebe und zweitens in eine
kontinuierliche metabolische Aufnahme durch das Gewebe.

Dieses Modell der Auxinaufnahme diente als Ausgangsbasis für
weitere Untersuchungen von BLACKMAN et al. (1959) an Lemna

minor und von WEDDING und BLACKMAN (1961) an Chlorella. Diese Forscher konnten mit Hilfe ^{14}C markierter 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure feststellen, daß der Wuchsstoff in der Zelle in einer Form festgelegt wird, die nicht mehr austauschbar ist, was durch anschließende Inkubation in einer unmarkierten 2,4-D-Lösung untersucht wurde. Einen weiteren Beweis dafür, daß eine metabolische Komponente bei der Aufnahme beteiligt ist, führten WEDDING und BLACKMAN (1961), indem sie durch Temperaturänderung sowie durch Inkubation im Licht und im Dunkeln verschieden hohe Wuchsstoffaufnahmen erzielten.

ANDREAE und van YSSELSTEIN (1956) hatten für die IES bei Erbsen-Epikotylen eine rein metabolische Aufnahme gefunden. Später (1960) ergab sich jedoch, daß auch ein physikalischer Schritt mitbeteiligt ist.

Im folgenden Kapitel werden nun die Ergebnisse dargestellt, die beim Studium der Aufnahme der drei aromatischen Säuren gewonnen wurden. Für jede Säure wurde ein anderes Pflanzengewebe gewählt, um dadurch Charakteristiken für verschiedene Gewebe zu erhalten.

Mit Benzoesäure-(7- ^{14}C) wurden ausgestanzte Scheibchen (1,1 cm Durchmesser) von jungen Spinat-Blättern mit 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-(1- ^{14}C) 0,5 cm lange Avena-Koleoptilzylinder inkubiert, während für die Versuche mit Indol-3-essigsäure-(1- ^{14}C) 1,0 cm lange Helianthus-Hypokotylstücke verwendet wurden. Jeweils 250 mg dieser Gewebe wurden in 6,25 ml der entsprechenden Säure von 10^{-4} m Konzentration 8 Std. lang (mit Ausnahme der Versuche für die Ermittlung der Kinetik) im Dunkeln leicht geschüttelt. In Vorversuchen wurde bei BzS und 2,4-D die gleiche Aufnahme im Dunkeln wie im Licht beobachtet; dies steht im Gegensatz zu den Versuchen von WEDDING und BLACKMAN an Chlorella (1961), die im Licht eine erhöhte Aufnahme des Wuchsstoffes fanden.

1. Der Einfluß des pH-Wertes auf die Aufnahme der Säuren.

In Abb. 1 sind nun die Ergebnisse der Experimente graphisch dargestellt, in denen die Aufnahme der Säuren in Abhängigkeit vom pH-Wert der Inkubationslösung untersucht wurde. Die Pufferkonzentration im Gesamtvolumen dieser Lösung war 10^{-2} m. Unter Verwendung von Citrat-Phosphat- und von reinem Phosphatpuffer (vgl. GOMORI, 1955) wurde der pH-Bereich zwischen 2,8 und 7,3 variiert; Acetatpuffer eignet sich für diese Versuche nicht, denn wie aus Abb. 2 hervorgeht, ist in Gegenwart von Acetatpuffer die Aufnahme der BzS von der Pufferkonzentration abhängig; dies wird auch noch in Tab. 2 berücksichtigt.

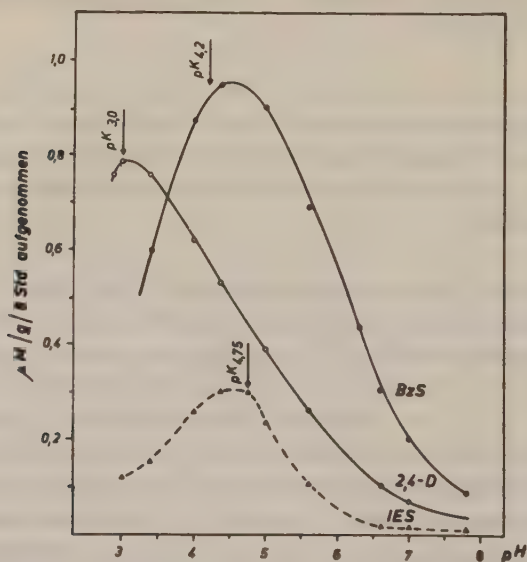


Abb.1: Einfluß des pH-Wertes der Inkubationslösung auf die Aufnahme von Benzoesäure-(7- 14 C) (BzS) durch Spinat-Blätter, von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-(1- 14 C) (2,4-D) durch Avena-Koleoptilen und von Indol-3-essigsäure-(1- 14 C) (IES) durch Helianthus-Hypokotyle. Die Konzentration der Inkubationslösung war 10^{-4} m in Bezug auf diese Säuren, 10^{-2} m in Bezug auf den Puffer. Inkubationsdauer 8 Std. Temperatur 21°C.

In allen 3 Experimenten stimmte der pK-Wert der entsprechenden Säure mit dem pH-Wert der maximalen Aufnahme überein. Dies bedeutet, daß es die undissoziierte Form der Säure ist, die von der Zelle aufgenommen wird (SIMON und BEEVERS, 1952). Für IES wurde die Aufnahme bei verschiedenem pH auch an Erbsen-Epikotylen untersucht und ebenfalls ein deutliches Optimum bei pH 4,75 gefunden; dies steht im Gegensatz zu den Untersuchungen von ANDREAE und van YSSELSTEIN (1961), die mitteilen, daß die Aufnahme der IES durch Erbsen-Epikotyle unabhängig vom pH-Wert des Inkubationsmediums sei. Das auffällige Abfallen der Aufnahmekurve bei pH-Werten unter dem pK-Wert der Säuren konnte bisher noch nicht geklärt werden. Eine Schädigung des Gewebes kann hierfür kaum verantwortlich gemacht werden, da die Atmungsintensität in dem betreffenden niederen pH-Bereich noch nicht absinkt.

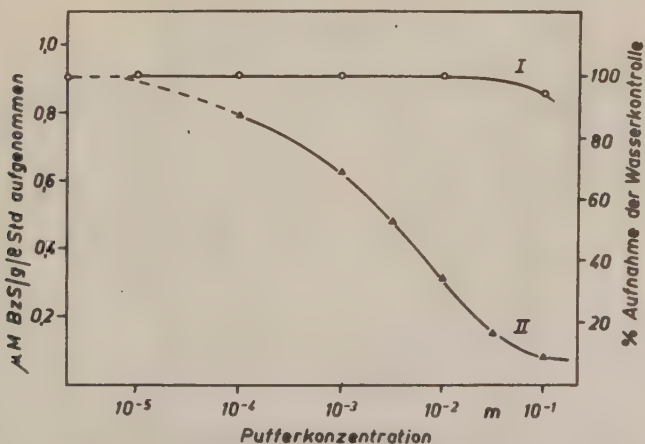


Abb. 2: Vergleich der Aufnahme 10^{-4} m Benzoesäure-(7- 14 C) (BzS) durch Spinat-Blätter.

I: Bei Verwendung verschiedener Phosphatpufferkonzentrationen von gleichem pH-Wert (5.3).

II: Bei Verwendung verschiedener Acetatpufferkonzentrationen von gleichem pH-Wert (5.3).

Inkubationsdauer 8 Std. Temperatur 21°C.

2. Der zeitliche Verlauf der Aufnahme der Säuren.

Um den zeitlichen Verlauf der Säureaufnahme in die Pflanzengewebe zu verfolgen, wurde an den Proben nach 1, 2, 4, 6, 9 und 12-stündiger Inkubation die Zunahme an Radioaktivität gemessen; die Ergebnisse sind in Abb. 3 dargestellt. Im Gegensatz zu 2,4-D, deren Aufnahme nach 2 Std. bereits ihr Maximum erreicht hat, ist bei BzS die Aufnahme bis zur 8. Stunde linear und bleibt von der 12. bis zur 24. Stunde konstant. Bei IES wurde ein allmähliches Absinken der Aufnahmegeschwindigkeit bis zur 12. Stunde beobachtet.

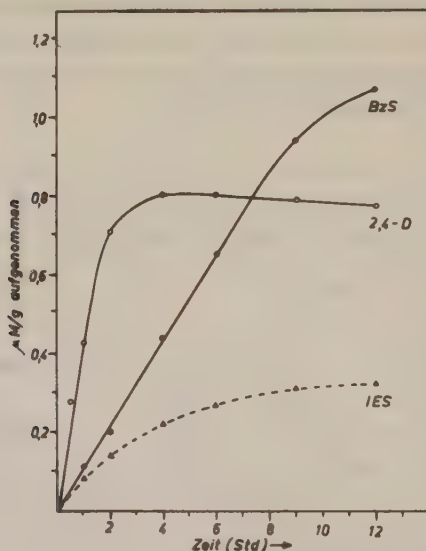


Abb. 3: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von Benzoesäure-(7- ^{14}C) (BzS) durch Spinat-Blätter, von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-(1- ^{14}C) (2,4-D) durch Avenakoleoptilen und von Indol-3-essigsäure-(1- ^{14}C) (IES) durch Helianthus-Hypokotyle. Inkubationsbedingung wie in Abb. 1.

3. Der Einfluß der Temperatur auf die Aufnahme der Säuren.

Die Versuche über den Einfluß der Temperatur auf die Aufnahme der angebotenen Säuren sind in Abb. 4 zusammengefaßt. Der Temperaturbereich wurde von 2,5°C bis 37°C variiert, eine Schädigung des Pflanzengewebes konnte weder bei den hohen noch bei den tiefen Temperaturen festgestellt werden. Das Maximum der Aufnahme von BzS liegt bei 21°C, der Q_{10} -Wert im Bereich von 10°-20°C beträgt 2,6; für 2,4-D wurde ein Optimum bei 19°C gemessen und ein Q_{10} -Wert im Bereich von 10°-20°C von 1,42 berechnet. Dagegen ist die IES-Aufnahme am höchsten bei 27°C, und der Q_{10} -Wert stimmt hier mit dem Wert für 2,4-D im Bereich von 5°-15°C ($Q_{10} = 1,40$) überein. (Der Verlust an aufgenommener IES durch Decarboxylierung wurde nicht berücksichtigt). Alle weiteren Versuche über die Aufnahme der 3 Säuren wurden jeweils bei 21°C durchgeführt.

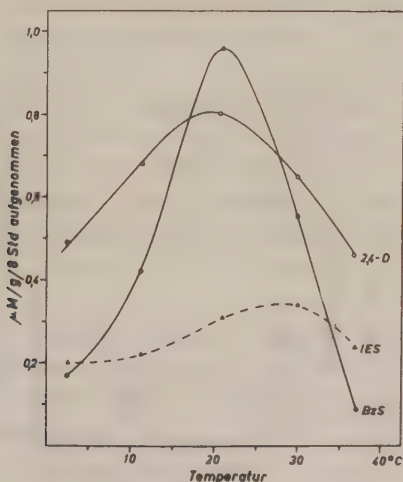


Abb. 4: Einfluß der Temperatur auf die Aufnahme von Benzoe-säure-(7-¹⁴C) (BzS) durch Spinat-Blätter, von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-(1-¹⁴C) (2,4-D) durch Avena-Koleoptilen und von Indol-3-essigsäure-(1-¹⁴C) durch Helianthus-Hypokotyle. Inkubationsbedingung wie in Abb. 1. Inkubationsdauer 8 Std.

4. Einfluß der Konzentration auf die Aufnahme der angebotenen Säuren.

In Abb. 5 wird der Einfluß der Konzentration der applizierten Säuren auf ihre Aufnahme gezeigt. Bei allen 3 Säuren ist im Bereich der Außenkonzentration von 3×10^{-4} m bis 3×10^{-3} m ein drastischer Anstieg der Aufnahme festzustellen. Da IES bei einer Erhöhung der Konzentration über 3×10^{-4} m toxisch wirkt, wurde lediglich die Aufnahme von BzS und 2,4-D bei noch höherer Konzentration untersucht. Dabei ergab sich, daß bei BzS in Lösungen über 10^{-2} m allmählich eine Sättigung eintritt. Ein Vergleich zwischen der aufgenommenen Säuremenge und der angebotenen Außenkonzentration der Säuren (3×10^{-4} m) zeigte, daß die Säure im Gewebe zwischen 2,2-(IES) und 10,7-fach (2,4-D) konzentriert wird. Es muß also eine Speicherung der Säuren gegen einen Konzentrationsgradienten erfolgen.

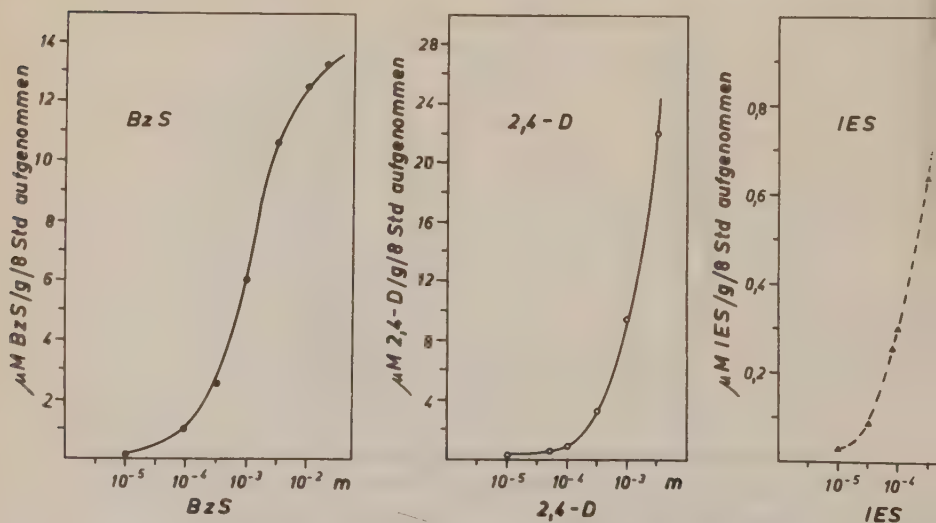


Abb. 5: Einfluß der Konzentration auf die Aufnahme von Benzoesäure-(7- ^{14}C) (BzS) durch Spinat-Blätter, von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-(1- ^{14}C) (2,4-D) durch Avenakoleoptilen, und von Indol-3-essigsäure-(1- ^{14}C) (IES) durch Helianthus-Hypokotyle. Die Pufferkonzentration in der Inkubationslösung betrug 10^{-2} m. Inkubationsdauer 8 Std. Temperatur 21°C .

5. Der Einfluß analoger Säuren und Hemmstoffe auf die Aufnahme der Säuren.

Die Wirkung der Zugabe von 10^{-4} m verschiedener Hemmstoffe zu der Inkubationslösung sind in Tab. 1 dargestellt. Es zeigt sich, daß Na-azid die Aufnahme der BzS um 90 %, die der IES um 49 % hemmt; von 2,4-D wird lediglich 10 % weniger aufgenommen. Auch Dinitrophenol setzt die Aufnahme stark herab. Im Gegensatz dazu sind Na-fluorid und Na-arsenat in dieser Konzentration nicht sehr wirksam.

Es wurde außerdem noch der Einfluß einiger D- und L-Aminosäuren auf die Aufnahme von BzS, 2,4-D und IES untersucht. Die Konzentration der konkurrierenden Säuren war auch in diesem Fall 10^{-4} m. Eine unterschiedliche Wirkung der D- und L-Formen konnte nur bei Tyrosin beobachtet werden, dessen D-Form die Aufnahme des Wuchsstoffes IES um 15 % hemmte, während die L-Form ohne Einfluß blieb.

Der Einfluß eines Auxins auf die Aufnahme eines anderen Wuchsstoffes wurde von REINHOLD (1954) und auch von JOHNSON und BONNER (1956) und von BLACKMAN et al. (1959) untersucht; WEDDING und BLACKMAN (1961) berechneten bei Chlorella, daß die Wirkung der IES auf die Aufnahme der 2,4-D einer kompetitiven Hemmung entspricht.

Es wurde daher auch der Einfluß einiger organischer Säuren auf die BzS-Aufnahme untersucht und, wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, eine Aufnahme-Hemmung gegenüber der Kontrolle von 30-50 % beobachtet.

Hemmstoffe	Konzentration d. Hemmstoffe	relative Aufnahme der BzS (%)	relative Aufnahme d. 2,4-D (%)	relative Aufnahme der IES (%)
Kontrolle	-	100,0	100,0	100,0
+ L-Asparaginsäure	10 ⁻⁴	62,5	99,0	100,0
+ D-Asparaginsäure	10 ⁻⁴	62,0	99,0	109,0
+ L-Tyrosin	10 ⁻⁴	87,0	102,0	100,0
+ D-Tyrosin	10 ⁻⁴	80,5	97,0	85,0
+ D-Phenylalanin	10 ⁻⁴	-	101,0	100,0
+ D,L-Phenylalanin	10 ⁻⁴	70,0	107,0	109,0
+ Na-azid	10 ⁻⁴	10,0	90,0	51,0
+ Dinitrophenol	10 ⁻⁴	15,0	75,5	41,0
+ Na-arsenat	10 ⁻⁴	60,0	82,0	99,0
+ Na-fluorid	10 ⁻⁴	100,0	80,5	99,0

Tab.1: Einfluß einiger Aminosäuren und Zellgifte auf die Aufnahme von Benzoesäure-(7-¹⁴C) (BzS) durch Spinat-Blätter von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-(1-¹⁴C) (2,4-D) durch Avena-Koleoptilen und von Indol-3-essigsäure-(1-¹⁴C) (IES) durch Helianthus-Hypokotyls. Inkubationsbedingungen wie in Abb. 1.

Hemmstoffe	Konzentration der Hemmstoffe	relative Aufnahme der BzS (%)
Kontrolle	-	100
+ Phenylelessigsäure	10 ⁻⁴	51
+ Naphthylelessigsäure	10 ⁻⁴	52
+ m-Hydroxybenzoesäure	10 ⁻⁴	56
+ 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	10 ⁻⁴	59
+ Na-acetat	10 ⁻⁴	61
+ 2,3,5-Trijodbenzoesäure	10 ⁻⁴	65
+ Oxalsäure	10 ⁻⁴	66
+ p-Hydroxybenzoesäure	10 ⁻⁴	69
+ Salicylsäure	10 ⁻⁴	70

Tab.2: Einfluß einiger organischer Säuren auf die Aufnahme von Benzoesäure-(7-¹⁴C) (BzS) durch Spinat-Blätter. Inkubationsbedingungen wie in Abb. 1.

6. Der Einfluß der Verarmungsdauer auf die Aufnahme der Indol-3-essigsäure durch dekapitierte Helianthus-Hypokotyle.

Ausgehend von den Versuchen von BRAUNER und BÖCK (1963) wurde bei dekapitierten Helianthus-Hypokotylen der Einfluß ihrer "Verarmung" auf die IES-Aufnahme untersucht. Wie aus Abb. 6 ersichtlich, ist die Aufnahme 1 Tag nach der Dekapitierung noch annähernd gleich groß wie bei intakten Pflanzen, sie fällt jedoch 3 Tage nach der Dekapitierung bereits auf 55 % ab. Dies ist wohl auf die Verarmung des Gewebes an Energie-reserven zurückzuführen.

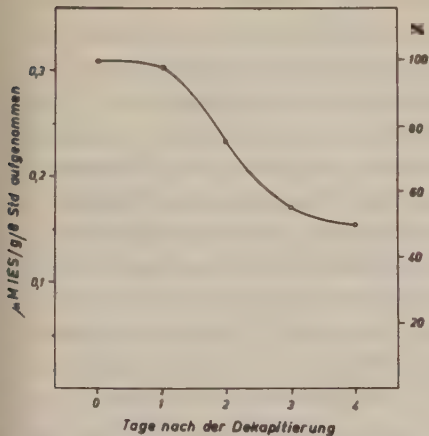


Abb. 6:

Helianthus-Hypokotyle:
Einfluß der Verarmungs-
dauer auf die Aufnahme
von Indol-3-essigsäure-
($1-^{14}\text{C}$). Außenkonzentration 10^{-4} m. Inkubationsbedingungen wie in Abb. 1 (pH 4,4).

Nach den Versuchen über den Einfluß des pH-Wertes, der Temperatur, der Außenkonzentration und der Inkubationszeit auf die Aufnahme von BzS, 2,4-D und IES, soll im folgenden Kapitel der Stoffwechsel der gleichen Säuren untersucht werden.

B. Stoffwechsel von Benzoesäure, 2,4-Dichlorphenoxyessig-
säure und Indol-3-essigsäure.

1. Die Stoffwechselprodukte der Benzoesäure.

In der Benzoesäure liegt der einfachste Typ einer aromatischen Carbonsäure vor. Die Stoffwechselprodukte dieser Säure, die im pflanzlichen Organismus auftreten, sollten charakteristisch für die ganze Reihe homologer Säuren sein und wurden daher eingehend untersucht.

Höhere Pflanzen (Erbsen-Epikotyle) wurden erstmals von ANDREAE und GOOD (1957) mit BzS inkubiert. Als Stoffwechselprodukte traten in diesem Gewebe hauptsächlich 2 Substanzen auf, die als Benzoylasparaginsäure und Benzamid von den genannten Autoren identifiziert wurden. Die Bildung der Benzoylasparaginsäure konnte bestätigt werden, während von ZENK (1962) eindeutig der Nachweis erbracht wurde, daß das Benzamid ein Artefakt darstellt, das aus einer energiereichen Benzoylverbindung und NH_4^+ -Ionen entstanden ist, die bei der Extraktion des Gewebes von ANDREAE und GOOD (1957) zugesetzt wurden. An Erbsen-Epikotylgewebe, das nach Inkubation in BzS-(7- ^{14}C) mit heißem 80 % Äthanol abgetötet worden war, stellte ZENK (1959) weitere Stoffwechselprodukte fest. KLÄMBT (1961) hat diese Produkte ebenfalls beobachtet und vermutet, daß es sich dabei um Glucose-1-benzoat (G-1-bz) und Glucose-6-benzoat (G-6-bz) handelt. Die von ihm zur chromatographischen Identifizierung herangezogenen Testsubstanzen erwiesen sich jedoch als wenig geeignet.

Zur Synthese des G-1-bz bediente sich KLÄMBT der direkten Acylierung von Glucose mit Benzoylchlorid. Diese Methode liefert jedoch mindestens 4 verschiedene Produkte, die nicht weiter identifiziert wurden. Eine elegante Synthese des G-1-bz, nach der wir unsere Testsubstanz herstellten, wurde von ZERVAS unter Verwendung von 4,6-Benzylidinglucose 1931 durchgeführt.

Bei dem von KLÄMBT (1961) zur Identifizierung nach FISCHER und NOTH (1918) synthetisierten und kristallisierten "G-6-bz" handelt es sich nicht um das Glucose-6-benzoat, sondern, wie bereits BRIGL und ZERRWECK (1934) festgestellt haben, um Glucose-3-benzoat. Das bei den Versuchen dieser Arbeit verwendete Präparat wurde nach ZINNER und Mitarbeiter (1957) in kristalliner Form dargestellt.

Es wurde nun der Versuch unternommen, das neben Benzoyl-asparaginsäure vorliegende zweite Hauptstoffwechselprodukt der BzS zu identifizieren. Dabei zeigte sich nach Inkubation von Erbsen-Epikotylen, Spinat-Blättern und Helianthus-Hypokotylen mit BzS-(7-¹⁴C) (10^{-4} m), daß in allen 3 Geweben die gleiche Substanz gebildet wurde. Dieser Benzoessäure-metabolit konnte durch präparative Chromatographie mit Whatman Nr. 3-Papier im Laufmittel Isopropanol : Benzin (100-140°C) : H₂O = 5,5 : 3 : 1,1 (Rf 0,31) und anschließender Rechromatographie in 80 % Isopropanol (Rf 0,77) in reiner Form isoliert werden. Wurde diese Substanz mit alkalischem Hydroxylamin (pH 12; 2 m) versetzt, konnte radioaktive Benzhydroxamsäure chromatographisch nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, daß es sich bei dieser Verbindung um einen Ester handelt. Die Substanz zerfiel nach alkalischer Hydrolyse in die von KLÄMBT (1961) beobachteten Spaltstücke BzS und Glucose, und zwar im Verhältnis 1 : 1, was sich auf Grund der spezifischen Aktivität der verwendeten BzS und der Bestimmung der Glucose nach NELSON (vgl. ASHWELL, 1957) berechnen ließ.

Nun erhob sich die Frage, an welchem C-Atom der Glucose die BzS verestert ist. Am wahrscheinlichsten war die Vermutung, daß die BzS an die OH-Gruppe des C₁-Atoms der Glucose gebunden ist, denn die entsprechenden 1-Glucose-ester verschieden substituierter Zimtsäuren (HARBORNE und CORNER, 1961) und auch der p-Hydroxybenzoessäure (BIRKOFER et al. 1961) wurden in zahlreichen Pflanzen gefunden. Andere Isomeren lassen sich jedoch nicht ausschließen. So wurde z.B. G-6-bz schon recht

frühzeitig aus Ericaceen isoliert (GRIEBEL, 1910). Sonstige Strukturisomere der Glucosebenzoesäure-ester wurden bisher in der Natur noch nicht aufgefunden.

Eine einwandfreie Auftrennung der Isomeren mittels Papierchromatographie ist im Gegensatz zu der Annahme von KLÄMBT (1961) ausgeschlossen. Eine Trennung von G-1-bz und G-6-bz wurde in etwa 120 verschiedenen Laufmitteln unter Verwendung von Papierchromatogrammen in 25 Laufmitteln mittels der Dünnschichtchromatographie und in 8 verschiedenen Puffern papierelektrophoretisch ohne Erfolg versucht.

Da jedoch das G-1-bz mit seiner Acetalbindung wesentlich energiereicher sein sollte als die an die vicinalen Hydroxylgruppen gebundene BzS, kam eine Trennung von G-1-bz und G-6-bz mit Hilfe der selektiven Hydrolyse in Betracht.

1.1. Trennung des G-1-bz von G-6-bz durch selektive Hydrolyse.

Zunächst wurde die Stabilität der beiden Verbindungen in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Temperatur untersucht. Die Hydrolyse wurde am Rückgang der Hydroxamsäurebildung verfolgt; dazu wurden 0,2 ml des Ansatzes mit 0,8 ml 2 m NH_2OH -Lösung (pH 12) versetzt und nach 20 min Reaktionszeit 3,0 ml Eisenchlorid-Reagens hinzugefügt (vgl. JONES und LIPMANN, 1955). Die Extinktion des Eisen-III-komplexes der Benzhydroxamsäure wurde bei 530 m μ spektralphotometrisch bestimmt. 1 μM Benzhydroxamsäure ergab dabei eine Extinktion von 0,295. Die Reaktion folgt dem Beerschen Gesetz über einen Konzentrationsbereich von 0,05 μM bis mindestens 3 μM . Abb. 7 zeigt, daß bei Zimmertemperatur beide Ester im sauren pH-Bereich stabil sind, während das G-1-bz im alkalischen Bereich sehr viel leichter hydrolysiert wird als das isomere G-6-bz. Eine quantitative Trennung auf Grund der leichteren Hydrolyse bei pH-Werten über 6,0 ist jedoch wegen der geringen Ausbeute an gespaltenem G-1-bz nicht durchzuführen. In Abb. 8 ist dieselbe

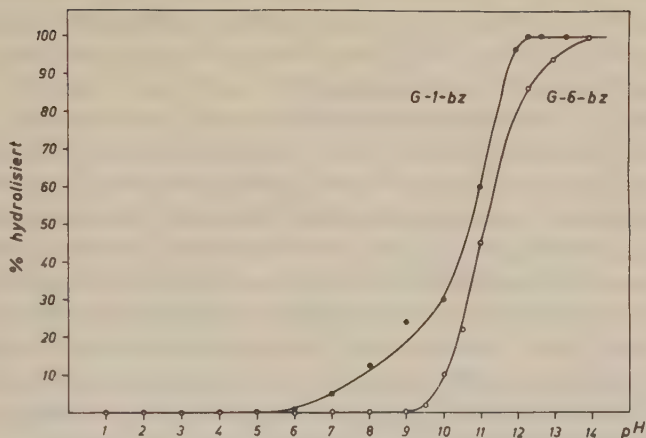


Abb. 7: Einfluß des pH-Wertes auf die Hydrolyse von Glucose-1-benzoat (G-1-bz) und Glucose-6-benzoat (G-6-bz). Temperatur: 21°C. Pufferkonzentration: 10^{-1} m (pH 1-2 KCl-HCl-, pH 3-7 Citrat-Phosphat-, pH 7-8 Phosphat-, pH 9-11 Carbonat-Bicarbonat-, pH 11-14 Phosphat-KOH-Puffer). Reaktionszeit 1 Std.

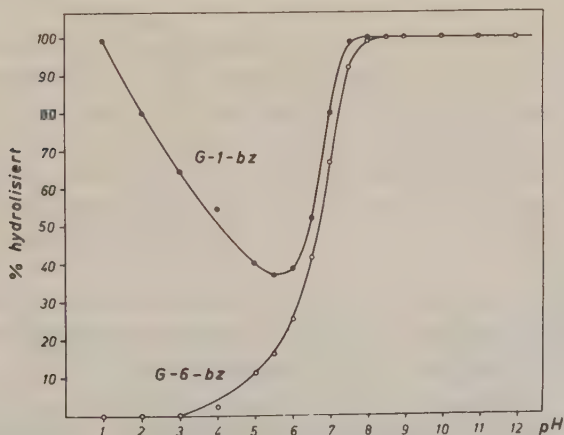


Abb. 8: Einfluß des pH-Wertes auf die Hydrolyse von Glucose-1-benzoat (G-1-bz) und Glucose-6-benzoat (G-6-bz). Temperatur: 98°C, Pufferkonzentration 10^{-1} m (Zusammensetzung wie in Abb. 7). Reaktionszeit 1 Std.

pH-Stabilität bei erhöhter Temperatur (98 °C) dargestellt. Während das G-6-bz im sauren Bereich zwischen pH 1,0 und pH 3,0 völlig stabil ist, wird G-1-bz bei pH 1,0 quantitativ gespalten, die Hydrolysenprodukte sind Glucose und BzS. Das G-1-bz scheint bei dieser Temperatur zwischen pH 5,5 und 6,0 am stabilsten zu sein. Diese selektive Hydrolyse des energiereichen G-1-bz bei saurem pH sollte nun eine quantitative Bestimmung der am C₁-Atom der Glucose gebundenen Acylgruppe ermöglichen. Die Spaltung wurde mit 1 m H₂SO₄ bei 98°C durchgeführt. In Abb. 9 ist die Kinetik der Hydrolyse von G-1-bz und G-6-bz aufgezeichnet. Nach 5 min ist das G-1-bz zu 100 % hydrolysiert, während G-6-bz nach diesem Zeitraum nur zu 12 % gespalten ist. Die Halbwertszeit der Hydrolyse beträgt für G-1-bz 1 Minute, die Hydrolysenkonstante bei 98°C $k = 230 \times 10^3$; als Halbwertszeit für G-6-bz wurden 53 Minuten und als Hydrolysenkonstante bei 98°C $k = 3,1 \times 10^3$ berechnet. Diese Verhältnisse entsprechen recht genau den für Glucose-1-phosphat und Glucose-6-phosphat gefundenen Werten.

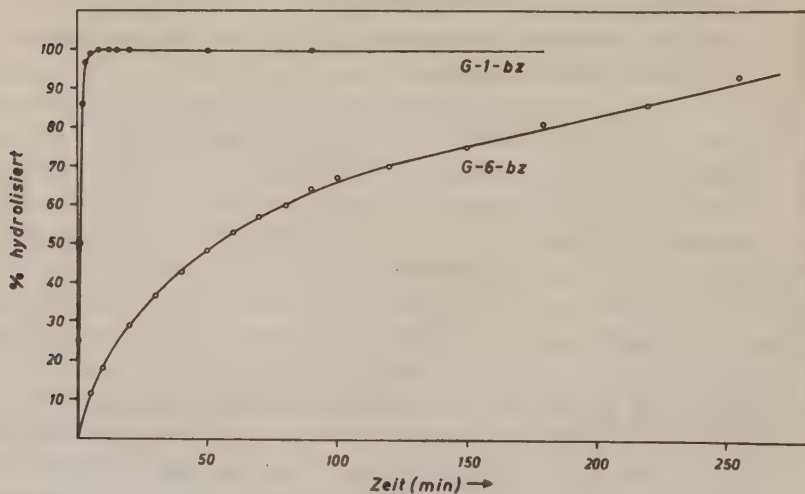


Abb. 9: Verlauf der Hydrolyse von Glucose-1-benzoat (G-1-bz) und Glucose-6-benzoat (G-6-bz) in 1 m H₂SO₄, bei 98°C.

Damit war ein Weg gefunden, G-1-bz in Anwesenheit von anderen Stellungsisomeren zu bestimmen. Die nach Inkubation mit radioaktiver BzS erhaltenen Stoffwechselprodukte wurden chromatographisch getrennt im Laufmittel Isopropanol : Benzin : H_2O = 5,5 : 3 : 1,1 (Glucosebenzoate Rf 0,51) und in Isopropanol : Ameisensäure : H_2O = 10 : 1 : 2 (Glucosebenzoate Rf 0,75) und die Glucosebenzoat enthaltende Bande mit H_2O abeluiert. Das Eluat wurde mit dem gleichen Volumen von 2 m H_2SO_4 versetzt (Gesamtvolumen 1,0 ml) und 5 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach dieser Zeit wurde es sofort im Eisbad gekühlt und durch Zugabe von 1,7 g festem $BaCO_3$ neutralisiert. Das kalte Gemisch wurde über Hyflow-Supercel (0,9 g) abfiltriert und mit 7,0 ml Wasser nachgewaschen. Das Filtrat, in dem die BzS (Radioaktivitätsanalyse) und der noch ungespaltene Ester (Hydroxamsäuretest) quantitativ zurückgewonnen werden konnte, wurde im Vakuum eingeeengt und chromatographiert im Laufmittel Butanol : Eisessig : H_2O : Glykol = 5 : 1 : 2,2 : 0,82 (BzS Rf 0,96, G-bz Rf 0,81). Das Verhältnis von ungespaltenem Glucosebenzoyl-ester und von BzS wurde durch Bestimmung der Radioaktivität ermittelt und ergab somit den relativen Betrag an C_1 -gebundener BzS.

Auf diese Weise wurden nun nach BzS-Inkubation von Helianthus-Hypokotylen und Vaccinium vitis-idaea-Blättern die Benzoate bestimmt. Wie aus Tab. 3 ersichtlich ist, scheinen die aus Helianthus-Hypokotylgewebe isolierten Glucosebenzoate zu 78 % aus G-1-bz zu bestehen, während in Vaccinium vitis-idaea 88 % der Glucosebenzoate nicht acetalgebundenes Benzoat sind.

Im Anschluß an diese Versuche sollte nun auch die Möglichkeit einer Umsetzung des energiereichen G-1-bz bei neutralem pH mit Hydroxylamin untersucht werden, um auf diese Weise eine Trennung vom energieärmeren G-6-bz zu erzielen.

	G-1-bz	unbekanntes Glucosebenzoat
Helianthus	78,4 %	21,6 %
Vaccinium	12,0 %	88,0 %

Tab.3: Auftrennung und prozentuale Verteilung der Glucosebenzoate aus Helianthus und Vaccinium, in Glucose-1-benzoat (G-1-bz) und ein unbekanntes Glucosebenzoat, nach Hydrolyse mit 1 m H_2SO_4 . (Nähere Angaben im Text.)

1.2. Getrennte Bestimmung von G-1-bz und G-6-bz durch Umsetzung mit Hydroxylamin.

Für die kolorimetrische Bestimmung des G-1-bz und G-6-bz wurde der Hydroxamsäure-Test bisher im stark alkalischen Milieu durchgeführt. Es interessierte nun, ob der Energiegehalt des G-1-bz eine Reaktion mit dem Hydroxylamin schon bei neutralem pH ermöglicht, nach Art der Acyl-CoA-Thioester oder der Acylphosphate.

Es zeigte sich, daß auch bei neutralem pH der C_1 -Ester der Glucose mit Hydroxylamin zu Benzhydroxamat reagiert. Für eine quantitative Reaktion ist jedoch eine hohe Hydroxylamin-Konzentration notwendig; so ist die Umsetzung von 1,35 μM G-1-bz erst in Gegenwart von 1700 μM $\text{NH}_2\text{OH}/\text{ml}$ bei pH 7,0 vollständig. Dabei ergab sich eine lineare Beziehung zwischen Hydroxylamin und Hydroxamatbildung durch den gesamten Bereich von 150-1700 $\mu\text{M}/\text{ml}$. Eine meßbare Umsetzung erfolgte bei einer geringeren Konzentration als 150 μM $\text{NH}_2\text{OH}/\text{ml}$ nicht.

Die Abhängigkeit der Umsetzung des G-1-bz und G-6-bz mit Hydroxylamin vom pH-Wert des Mediums zeigte, daß G-1-bz bei pH 7,0 schon nahezu vollständig (zu 92 %) mit NH_2OH reagiert, während mit G-6-bz erst ab pH 8,0 eine Reaktion erfolgt.

Wird mit recht hohen Hydroxalamin-Konzentrationen gearbeitet, so kann eine quantitative, getrennte Bestimmung von G-1-bz und G-6-bz auf folgende Weise erreicht werden. Der gesamte Reaktionsansatz wird trotz der hohen Salzkonzentration auf Whatman Nr. 3-Papier strichförmig aufgetragen und das Chromatogramm in Butanol : Eisessig : H_2O : Glykol = 5 : 1 : 2,2 : 0,82 entwickelt. Es trennt sich dabei die Benzhydroxamsäure (Rf 0,91) von dem nicht umgesetzten G-bz (Rf 0,81) und von eventuell noch vorliegender BzS (Rf 0,96) außerordentlich scharf ab. Die Auswertung der Chromatogramme mit dem Endfensterzählrohr ergibt die Verteilung der einzelnen Glucosebenzoate. Jedoch ist der Weg der selektiven Hydrolyse dieser Methode vorzuziehen, weil die hohen Salzkonzentrationen doch manchmal zu einer Verzerrung der Banden und damit zu einer Erschwerung der Auswertung führen. Eine Kontrolle der in Tab. 3 dargestellten, durch selektive Hydrolyse gewonnenen Ergebnisse mit dieser Methode zeigte gute Übereinstimmung ($\pm 5\%$) der Verteilung der Glucosebenzoate in *Helianthus* und *Vaccinium*. Die 1-Acyl-glucose-ester müssen also einen bemerkenswert hohen Energiegehalt besitzen, vergleichbar mit dem der Thioester- und Phosphat esterbindungen.

Der Beweis für das Auftreten von G-1-bz war somit auch für die Pflanze erbracht. G-1-bz wurde erstmals von QUILICO et al. (1959) in der Natur als Abscheidungsprodukt des Laterocervical-Organs von Plattiden entdeckt und "Periplanetin" benannt.

Die Frage nach der Struktur des Glucosebenzoates in *Vaccinium vitis-idaea* blieb noch unentschieden.

1.3. Chemischer Abbau des aus *Vaccinium vitis-idaea* isolierten Glucosebenzoates.

G-6-bz, das früher auch Vacciniin genannt wurde, konnte erstmals von GRIEBEL (1910) aus Preiselbeer-Saft isoliert werden. Trotz der Bemühungen von FISCHER und NOTH (1918) gelang es erst BRIGL und ZERRWECK (1934) das Glucosebenzoat als

6-O-Benzoylglucose zu identifizieren, und zwar mit Hilfe einer synthetischen, eindeutig in 6-O-Stellung benzozylierten Glucose.

Die Isolierung der natürlich vorkommenden Glucosebenzoate aus dem Saft von *Vaccinium vitis-idaea* Beeren wurde unter Zusatz von basischem Bleiacetat durchgeführt. Das Bleiacetat ermöglicht nun aber eine Wanderung des Benzoylrestes aus der 2-Stellung in die 6-Stellung, wie das Beispiel des 6-O-Benzoyl-Salicins (Populin) zeigt, das vor kurzem als Aufarbeitungsartefakt erkannt wurde (PEARL und DARLING, 1963). So besteht die Möglichkeit, daß das von BRIGL identifizierte G-6-bz aus *Vaccinium* ebenfalls ein durch zugesetztes Bleiacetat hervorgerufenes Artefakt ist.

Das in *Vaccinium* vorkommende Glucosebenzoat sollte daher unter Vermeidung von Bleiacetat erneut untersucht werden. Als möglicher Weg zur Identifizierung bot sich dabei der Abbau des Glucosebenzoates zu Benzoylglykolsäure-ester in Analogie zum Glucoseabbau von SIMON und STEFFENS (1962) an. Die Synthese des 6-O-Benzoyl-glucose-phenylhydrazons bereitet jedoch Schwierigkeiten; darum wurde der Weg einer direkten Reduktion des Glucosebenzoates zum 6-O-Benzoyl-mannit eingeschlagen. Die anschließende Spaltung wurde mit Kaliumpermanganat durchgeführt, allerdings nicht wie bei SIMON und STEFFENS in Aceton sondern im wässrigen Milieu, was zwar den Nachteil hat, daß bei der Oxydation gleichzeitig starke Verseifung eintritt, dafür aber den Vorteil bietet, daß der Sorbit nicht isoliert werden muß.

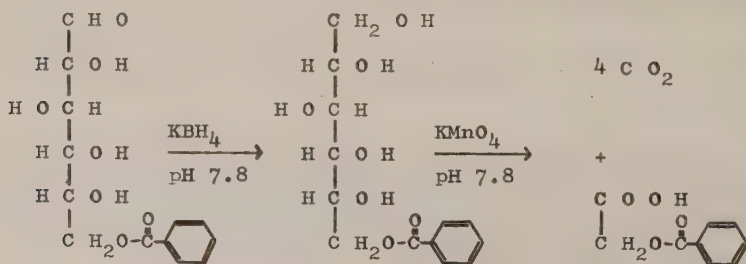


Abb.10: Schema des Abbaus von G-6-bz zu Glykolsäure-benzoyl-ester.

Die Reduktion der Aldehydgruppe des Glucosebenzoates bot keine Schwierigkeiten und war nach 2 Std. beendet. Es trat dabei, wie mit dem Hydroxamsäure-Test erfaßt werden konnte, keinerlei Hydrolyse des Esters ein (Abb. 11).

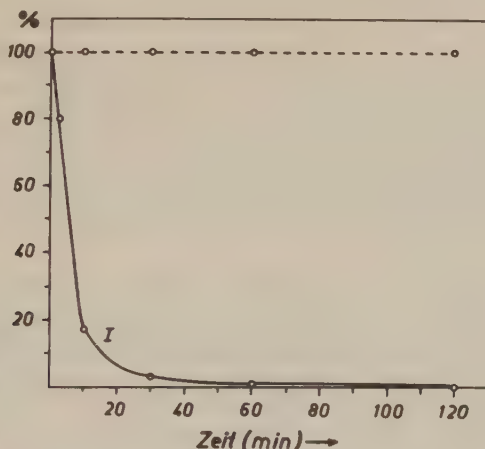


Abb. 11: Kinetik der Reduktion von Glucose-6-benzoat mit KBH_4 .

I : Abnahme der Aldehydreaktion von Glucose-6-benzoat (%).

II: Stabilität der Esterbindung während der Reduktion (%).

Der Abbau des Glucosebenzoates wurde auf folgende Weise durchgeführt:

Das Glucosebenzoat wurde aus Vaccinium-Blättern nach 24-stündiger Inkubation mit 10^{-4} m $\text{BzS-(7-}^{14}\text{C)}$ chromatographisch isoliert und durch selektive Hydrolyse, wie oben beschrieben, von G-1-bz befreit. Das Benzoat ($2 \mu\text{M}$) wurde daraufhin mit $40 \mu\text{M}$ nicht markiertem Träger-G-6-bz verdünnt ($1160 \text{ ipm}/\mu\text{M}$) und in $0,5 \text{ ml}$ Phosphatpuffer pH 7,8 aufgenommen. Nach Zugabe von 54 mg KBH_4 wurde die Lösung 2 Std. bei Zimmertemperatur gerührt. Daraufhin wurden 60 mg KMnO_4 zugesetzt und das Gemisch weitere 90 min gerührt. Der Ansatz wurde, auf 0°C abgekühlt, mit $0,5 \text{ n}$ H_2SO_4 angesäuert, mit Na_2SO_3 versetzt,

bis sämtlicher Braunstein gelöst war, und dann mit Äther mehrmals extrahiert. Die Ätherphase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, der Äther im Vakuum entfernt und der Rückstand auf Kieselgel G-Dünnschichtplatten im Laufmittel Toluol : Äthylformiat : Ameisensäure = 50 : 40 : 10 chromatographiert (G-6-bz Rf 0,19, Glycolsäurebenzoyl ester Rf 0,59, Benzoessäure Rf 0,69). Die Glycolsäurebenzoyl esterbande wurde mit einer synthetischen Probe* identifiziert, abeluiert und die spezifische Aktivität des Esters ermittelt (1200 ipm/ μM). Es zeigte sich, daß sie mit der Aktivität des Ausgangs-Glucosebenzoates genau übereinstimmte, d.h. daß das Glucosebenzoat aus Vaccinium 6-O-Glucosebenzoat ist.

Neben diesen Stoffwechselprodukten der BzS, wie Benzoylasparaginsäure, G-1-bz und G-6-bz, wird Benzoessäure zum Teil auch hydroxyliert, wie dies schon von IBRAHIM und TOWERS (1959) beobachtet wurde. Auf diese Reaktion wird später noch eingegangen.

1.4. Enzymatische Synthese des Glucose-1-benzoates.

Nach Inkubation von Linsen-Keimlingen mit Anthranilsäure konnten TABONE und Mitarbeiter (1956, 1958) in einer Reihe von Arbeiten zeigen, daß diese Säure in der Pflanze zu dem 1-Glucose-ester umgesetzt wird. Die Autoren bereiteten später aus Linsenhomogenaten ein zellfreies System, das mit Uridindiphosphatglucose (UDPG) und freier Anthranilsäure den Ester bildete.

Es lag nun nahe anzunehmen, daß es sich bei der Biosynthese des G-1-bz um das gleiche enzymatische System handelt, das unspezifisch aromatische Säuren mit Glucose esterifiziert. So wurde zunächst versucht, die enzymatische Synthese des Esters auch mit BzS und UDPG im zellfreien System zu erhal-

* Für die Überlassung der synthetischen Vergleichssubstanz sei Herrn Dr. H. Simon, Technische Hochschule, München, sehr herzlich gedankt.

ten. Es zeigte sich jedoch, daß in den von uns verwendeten Systemen (Erbsen- und Spinat-Homogenate sowie -Acetonpulvern) die Aktivität der β -Glucosidase (Emulsin) so hoch war, daß es zu gar keiner Akkumulierung des Esters kommen konnte. Die Synthese des G-1-bz wurde daher mit dem von JACOBELLI et al. (1958) aus Linsen isolierten Enzymsystem versucht.

4 Tage alte Keimlinge wurden im Homogenisator mit eiskaltem Wasser 5-10 min zerkleinert und abzentrifugiert; die überstehende Flüssigkeit wurde mit Ammoniumsulfat fraktioniert. Das Präcipitat zwischen der 50-70 % Sättigung wurde in Wasser aufgenommen und 6 Std. bei 2°C dialysiert. Diese Proteinfraktion wies nur eine geringe Emulsin-Aktivität auf.

Das Reaktionsgemisch enthielt 0,3 ml Enzymlösung (= 4,5 mg Protein), 0,1 ml 1 M Citrat-Phosphatpuffer pH 6,1; 6 μ M BzS-(7-¹⁴C) (= 1 μ c) und 2 mg UDPG. Nach 3-stündiger Inkubationsdauer bei 26°C wurde das Gemisch mit Butanol mehrmals ausgeschüttelt und dieser Extrakt papierchromatographisch in Butanol : Eisessig : H₂O : Glykol = 5 : 1 : 2,2 : 0,82 getrennt (G-bz Rf 0,81, BzS Rf 0,96). Die Auswertung der Chromatogramme und die Verrechnung über die spezifische Aktivität der BzS ergab eine Bildung von 0,19 μ M G-1-bz nach 3-stündiger Inkubationsdauer. Der Ester wurde mit 1 M H₂SO₄ bei 100°C in 5 min völlig gespalten, was die Natur des am 1-O der Glucose gebundenen Esters beweist. Dadurch ist wahrscheinlich gemacht, daß es sich bei der Esterifizierung der aromatischen C₇-Säuren mit UDPG um ein gruppenspezifisches Enzym handelt, das vielleicht auch für die Synthese der in den Pflanzen so außerordentlich häufig vorkommenden Zimtsäureglucose-ester verantwortlich ist.

Es lag nahe, die enzymatische Synthese des G-6-bz in Analogie zur 6-O-Acetyl-thiogalaktosid-Synthese (vgl. ZABIN et al. 1962) durchzuführen. Die Biosynthese erfolgt über Acetyl-CoA als energiereiches Zwischenprodukt und Transacetylierung in 6-Stellung. Entsprechende Versuche mit Benzoyl-CoA und Glucose

in einem zellfreien System aus *Vaccinium* ergaben jedoch keine G-6-bz-Synthese. Wahrscheinlich lag der Grund in der außerordentlich geringen Proteinkonzentration dieser Blätter und der Aktivität der Benzoyl-CoA-decylase des Extraktes.

Nachdem nun die Hauptmetabolite der BzS erkannt worden waren, sollten die Stoffwechselprodukte einer weiteren aromatischen Säure, der 2,4-D, untersucht werden.

2. Die Stoffwechselprodukte der 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure.

2,4-D wurde während des 2. Weltkrieges als Herbizid entwickelt, und schon anfangs der 50-iger Jahre begann man die Stoffwechselprodukte dieser Säure zu untersuchen. So fanden WEINTRAUB und Mitarbeiter (1952), daß 2,4-D zahlreiche chemische Umwandlungen erfährt, wenn sie über einen Zeitraum von mehreren Monaten an Bohnenpflanzen verfüttert wird. Definierte Stoffwechselprodukte der 2,4-D konnten jedoch von diesen Autoren nicht erfaßt werden. Im selben Jahr (1952) fanden JAROWSKI und BUTTS nach Applizierung von 2,4-D an Bohnenpflanzen 2 Metabolite, von denen sie den einen als Glucosid oder Proteinkomplex der 2,4-D diskutierten, da sich aus dieser Substanz nach Behandlung mit Emulsin 2,4-D wieder freisetzen ließ.

ANDREAE und GOOD (1957) inkubierten Erbsen-Epikotyle mit 2,4-D und stellten fest, daß, im Gegensatz zu IES und BzS, 2,4-D nur eine geringe metabolische Umwandlung erfährt. 2,4-D wird nicht oxydativ decarboxyliert, und 95 % der applizierten Säure lassen sich in freier Form zurückgewinnen. Lediglich 5 % des Auxins wurden in diesem Gewebe in 2 Substanzen umgewandelt, wobei die eine chromatographisch als 2,4-Dichlorphenoxyacetyl-asparaginsäure durch Vergleich mit der synthetischen Substanz identifiziert werden konnte. ANDREAE und GOOD vermuteten nun, daß die Beständigkeit der 2,4-D im Gewebe, die nicht nur von der Stabilität gegen oxydativen Abbau, sondern auch von der geringen Möglichkeit zur Konjugierung herrührt, der Grund für die außerordentlich herbicide Wirkung der 2,4-D ist.

KLÄMBT (1961) untersuchte den 2,4-D Stoffwechsel an Weizen-Koleoptilen und konnte ebenfalls das Auftreten von 2,4-Dichlor-phenoxyacetylasparaginsäure wahrscheinlich machen. Daneben fand er noch 7 nicht weiter aufgeklärte Substanzen, von denen lediglich eine auf den Papierchromatogrammen eine ähnliche Position aufwies wie die Glucose-ester der IES oder BzS und daher als 1-(2,4-D)-Glucose-ester angesprochen wurde.

Im gleichen Jahr erhielt BACH (1961) durch Gegenstromverteilung der Wasser-, Alkohol- und Ätherextrakte von Bohnenpflanzen, denen zuvor 2,4-D-(1-¹⁴C) mit hoher spezifischer Aktivität (22 µc/µm) appliziert wurde, mindestens 20 verschiedene Metabolite. Bei einem Teil der Stoffwechselprodukte konnte er zwar feststellen, daß sie Phenol- oder Alkoholgruppen enthielten, die Aufklärung irgend eines Metaboliten gelang ihm jedoch nicht. Das Auftreten der schon früher als Stoffwechselprodukt diskutierten 6-Hydroxy-2,4-D konnte er nicht bestätigen.

Da die Identifizierung der 2,4-D-Metabolite wegen ihrer geringen Konzentration außerordentlich schwierig ist, wurde lediglich das Problem der Resistenz der Pflanzen gegen 2,4-D im Zusammenhang mit der Konjugierung des Auxins betrachtet.

Es hatte sich nämlich nach ausgiebiger Verwendung von 2,4-D als Unkrautbekämpfungsmittel herausgestellt, daß gewisse Pflanzen überaus 2,4-D empfindlich sind; diesen sogenannten "sensitiven" Pflanzen stehen die 2,4-D "resistenten" Pflanzen gegenüber. Die frühere Annahme, daß nur monokotyle Pflanzen gegen dieses synthetische Auxin resistent sind, hat sich nicht bewahrheitet (vgl. AUDUS, 1959).

Aus der Sicht des Stoffwechsels der Auxine wäre immerhin die Hypothese abzuleiten, daß die Unfähigkeit der IES oder der Naphthyllessigsäure als Herbicid zu wirken, darauf beruht, daß die Pflanzen diese Auxine in Glucose-ester oder Asparaginsäurederivate umwandeln, oder wie im Fall der IES, durch die IES-Peroxydase abbauen, daß also die Auxine in Verbindungen

überführt werden, die nicht mehr wachstumsfördernd sind (ZENK, 1961). Im Gegensatz dazu steht 2,4-D, die, wie sich am Beispiel der Erbsen zeigen ließ, nicht metabolisiert wird.

Die Möglichkeit, daß 2,4-D in den "resistenten" Pflanzen durch Konjugierung inaktiviert wird, während die "sensitiven" Pflanzen einen solchen Mechanismus nicht besitzen, blieb noch offen. Der Stoffwechsel der 2,4-D in "resistenten" und "sensitiven" Pflanzen sollte daher im Hinblick auf diese Möglichkeit untersucht werden.

Vertreter der beiden Pflanzengruppen werden nach den Angaben von AUDUS (1959) ausgewählt. 1 g ausgestanzter Blattstücke (1,1 cm Durchmesser) der entsprechenden Pflanzen wurden in 12,5 ml 5×10^{-5} m 2,4-D-(1- 14 C) (= 0,5 μ c) 24 Std. inkubiert und, wie unter "Material und Methoden" beschrieben, aufgearbeitet. Die Extrakte wurden auf Chromatographiepapier (Schleicher und Schüll 2043b) aufgetragen und aufsteigend chromatographiert in dem Lösungsmittel: Butanol : Eisessig : Wasser = 5 : 1 : 2,2. 2,4-Dichlorphenoxyacetylasparaginsäure (R_f 0,30) wurde anhand synthetischen Materials identifiziert; der 1-(2,4-D)-glucose-ester (R_f 0,72) wurde durch Spaltung mit Emulsin charakterisiert. Die Verteilung der Stoffwechselprodukte ist aus Tab. 4 zu ersehen.

Aus einem Vergleich der gewonnenen Ergebnisse darf geschlossen werden, daß die Konjugierung der 2,4-D keinen Einfluß darauf hat, ob die betreffende Pflanze nun dem "resistenten" oder "sensitiven" Typ angehört. In beiden Pflanzengruppen ist der überwiegende Teil der Radioaktivität in der freien 2,4-D zu finden. Die Konjugierung mit Glucose scheint relativ häufig, sowohl bei "resistenten" als auch bei "sensitiven" Pflanzen zu sein, während die Konjugierung mit Asparaginsäure in nennenswertem Maße nur bei den "resistenten" Pflanzen auftritt. Die absolute Menge der durch Konjugierung mit Asparaginsäure inaktivierten 2,4-D ist jedoch so gering, daß die "Resistenz" nicht darauf beruhen kann. Außerdem besitzen manche Pflanzen

I. 2,4-D "resistente" Pflanzen

	2,4-D %	2,4-D- Glucose- ester %	2,4-Di- chlorphen- oxyacetyl- asparagin- säure %	unbe- kannte Pro- dukte %
<i>Aegopodium podagraria</i>	74	2,7	23,3	o
<i>Agropyron repens</i>	72	11,0	6,6	10,4
<i>Ajuga reptans</i>	100	o	o	o
<i>Avena sterilis</i>	80	20,0	o	o
<i>Claytonia perfoliata</i>	58	4,6	15,8	21,6
<i>Crepis biennis</i>	95	5,0	o	o
<i>Chrysanthemum segetum</i>	91	9,0	o	o
<i>Elisena longipetala</i>	92	4,6	o	3,4
<i>Fraxinus excelsior</i>	100	o	o	o
<i>Iris kaempferi</i>	56	12,2	8,6	23,2
<i>Ipomea purpurea</i>	89	10,5	o	0,5
<i>Melandrium rubrum</i>	94	6,0	o	o
<i>Poa annua</i>	66	15,2	o	18,8
<i>Roscoea humeana</i>	94	6,0	o	o
<i>Saccharum officinale</i>	93	7,0	o	o
<i>Viola odorata</i>	77	7,0	o	16,0
<i>Zea mays</i>	87	7,0	6,0	o

II. 2,4-D "sensitive" Pflanzen

<i>Allium cepa</i>	94	6,0	o	o
<i>Ampelopsis quinquefolia</i>	90	10,0	o	o
<i>Antirrhinum majus</i>	100	o	o	o
<i>Gossypium herbaceum</i>	94	6,0	o	o
<i>Helianthus annuus</i>	98	2,0	o	o
<i>Lythrum salicaria</i>	76	24,0	o	o
<i>Musa cavendishii</i>	100	o	o	o
<i>Musa velutina</i>	90	10,0	o	o
<i>Nicotiana tabacum</i>	99	1,0	o	o
<i>Phasaeolus coccineus</i>	70	o	o	30
<i>Rhizinus communis</i>	93	7,0	o	o

Tab.4: Prozentuale Verteilung der 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-Stoffwechselprodukte in 2,4-D "resistenten" (I) und 2,4-D "sensitiven" (II) Pflanzengeweiben. Inkubationsmedium: 5×10^{-5} m 2,4-D-(1- 14 C) in 12,5 ml/g Fgw. Inkubationsdauer 24 Std. Temperatur 21°C.

dieser Gruppe diesen Mechanismus der Konjugierung mit Asparaginsäure gar nicht. In einigen Fällen, besonders bei *Claytonia perfoliata*, wurden auch Stoffwechselprodukte beobachtet, die weder dem Asparaginsäure- noch dem Glucose-Typ angehörten; diese Produkte wurden jedoch noch nicht weiter analysiert.

Damit fällt die Hypothese, daß der Unterschied zwischen "sensitiven" und "resistenten" Pflanzen in der gruppenspezifischen Ausbildung eines 2,4-D-Inaktivierungsmechanismus liegen könnte.

Die letzte Säure, deren Stoffwechselprodukte noch betrachtet werden sollten, war die IES. Die Metabolite dieses Auxins in der Pflanze sind schon sehr eingehend untersucht worden, so daß besonderer Wert lediglich auf die Untersuchung eines lang postulierten Komplexes zwischen IES und Protein, sowie auf den katabolischen Stoffwechsel dieser Säure in der Pflanze zu legen war.

3. Die Stoffwechselprodukte der Indol-3-essigsäure.

Bei der Suche nach Hinweisen auf den Wirkungsmechanismus des Auxins wurde der Weg des Wachstoffs während der Zellstreckung und die Stoffwechselveränderung, die er dabei erfährt, besonders von ANDREAE et al. (1955-1961) untersucht. Durch diese Arbeiten wissen wir, daß Indol-acetyl-asparaginsäure als hauptsächlichstes Reaktionsprodukt der IES in der Pflanze gebildet wird. Indol-acetamid, das von den Autoren ebenfalls postuliert wurde, hat sich als Artefakt der Aufarbeitungsmethode herausgestellt (ZENK, 1961). In der folgenden Zeit (KLÄMBT, 1961; ZENK, 1961) wurde 1-(Indol-3-acetyl) β -D-Glucose als weiteres Stoffwechselprodukt gefunden.

Beide Metabolite stellten sich als Entgiftungsprodukt der IES heraus (ZENK, 1961, 1963). Wie im Tier wird also auch in der Pflanze die IES über die Bindung an eine Aminosäure

oder als Glucosid entgiftet. Ein Zusammenhang dieser Produkte mit der Auslösung des Wachstumsvorganges in der höheren Pflanze besteht nicht.

Es wurde nun versucht, ein weiteres Stoffwechselprodukt der IES nachzuweisen, einen Komplex zwischen IES und einem Zellprotein, der seit 20 Jahren als wichtiges Glied in der Auxinwirkungskette postuliert wird (vgl. AUDUS, 1959).

3.1. Nachweis Protein-gebundener Indol-3-essigsäure.

Der erste Hinweis auf das Vorkommen eines Auxin-Proteinkomplexes stammt von WILDMAN und GORDON aus dem Jahre 1942. Die Autoren konnten aus Spinat-Blätterproteinen Auxin nach Proteolyse isolieren. In einer späteren Arbeit gelang es GORDON (1946), aus Proteinen von Weizenkörnern sowohl durch milde alkalische Hydrolyse als auch durch enzymatischen Abbau IES freizusetzen.

Diesen Auxin-Proteinkomplexen wurde nun von HANSCH und MUIR (1951) die eigentliche katalytische Funktion bei der Wachstumsauslösung zugeschrieben. Ausgehend von Untersuchungen über die Aktivität von ortho-chlor-substituierten Phenoxyessigsäuren und von kinetischen Untersuchungen mit synthetischen Auxinen und Antiauxinen von FOSTER et al. (1952) wurde die "zwei Punkte Theorie" formuliert. Sie besagt, daß die Carboxylgruppe und der in einer ortho-Stellung unsubstituierte Ring des Auxins mit einem Proteinreceptor reagieren und so den aktiven Wuchsstoffkomplex liefern. Die Theorie konnte von WAIN (1955), nachdem er die Notwendigkeit des α -Wasserstoffatoms für die Wuchsstoffwirksamkeit des Moleküls erkannt hatte, noch erweitert werden. Diese drei wesentlichen Gruppen, nämlich

1. ein ungesättigtes Ringsystem,
2. eine Carboxylgruppe und
3. ein α -ständiges Wasserstoffatom

sollen über die Wuchsstoffaktivität einer Verbindung entscheiden. Übereinstimmend wird heute angenommen, daß das Wuchsstoff-

molekül mit einem spezifischen Receptorprotein einen sterischen Komplex bildet, der dann den Wachstumsvorgang in der Zelle auslöst.

Solch ein Wuchsstoffproteinkomplex konnte bisher jedoch noch nicht isoliert werden. Lediglich SIEGEL und GALSTON (1953) versuchten, dieses wichtige Konjugat zwischen Protein und Auxin in vivo und in vitro nachzuweisen. Sie inkubierten Erbsenwurzeln mit hohen IES-Konzentrationen, isolierten die Wurzelproteine und konnten dann proteingebundenen Wuchsstoff nachweisen. Der Auxinkomplex wurde jedoch von ANDREAE und van YSSELSTEIN (1960) als Artefakt erkannt. Auch die Meinung von SIEGEL und GALSTON, daß sie den Komplex auch in vitro erhalten hätten, beruhte offenbar auf einem Irrtum. ZENK (1963) konnte feststellen, daß für diesen Befund ein Artefakt verantwortlich war: die Präzipitierung der Proteine durch Trichloressigsäure in Gegenwart von Auxinen.

Es sollte daher durch ausgiebige Dialyse und Gelfiltration von Proteinen nach Inkubation von Erbsen-Epikotylen mit IES-(1-¹⁴C) nochmals der Versuch gemacht werden, solch ein Konjugat zwischen IES und Protein zu erfassen.

25 g Erbsen-Epikotyle wurden in 250 ml einer 10^{-5} m IES-(1-¹⁴C)-Lösung (= 10 μ c) (pH 4,4) 12 Std. im Dunkeln bei 21°C leicht geschüttelt. Nach Abgießen der Inkubationslösung und Nachspülen mit kaltem Wasser wurde aus dem Gewebe Acetonpulver nach NEISH (1961) hergestellt und gegen 3 % Na_2HPO_4 bei 2°C dialysiert. Die Zellbruchstücke wurden nach 12 Std. abzentrifugiert und der Überstand nochmals 48 Std. unter den selben Bedingungen dialysiert.

Zur weiteren Aufarbeitung wurde der Extrakt mit Aquacide (Calbiochem) auf ein Volumen von 0,5 ml eingeeengt und nach Zugabe von 0,5 μ M Träger-IES 30 min equilibriert. Das Protein-IES-Gemisch wurde auf eine eisgekühlte Sephadex-Säule G 25 gegeben, die mit 3 % Na_2HPO_4 für die Gelfiltration vorbehandelt

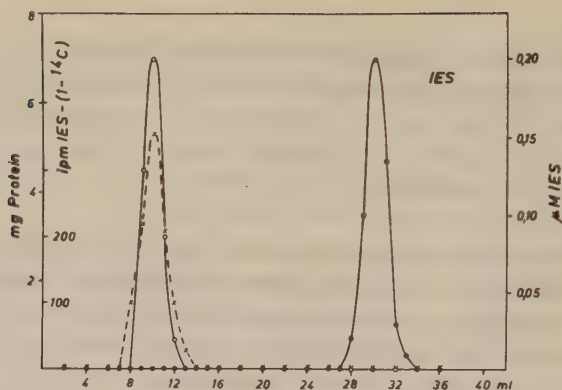
worden war. Die Trennung von Protein und Säure (Abb. 12/I) wie auch deren Rückgewinnung war sehr vollständig. Letztere betrug für Protein 101 %, für IES 98 %. Radioaktivität war nur in den proteinhaltigen Proben nachzuweisen; die freie IES war nicht radioaktiv.

Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, mit 2 n KOH bei 98°C hydrolysiert, und das angesäuerte Hydrolysat mit Äther extrahiert. Nach Abdampfen des Äthers enthielt der Rückstand 81 % der eingesetzten Radioaktivität des Proteins. Der in Phosphatpuffer pH 7,8 aufgenommene Ätherrückstand wurde nun mit Riboflavin photolysiert (ZENK, 1963), das $^{14}\text{CO}_2$, das aus der Carboxylgruppe der IES stammte, als BaCO_3 gefällt und die Radioaktivität im Methandurchflußzähler bestimmt. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß die markierte Substanz der Proteinfraktion wirklich noch IES war, denn 90 % der Radioaktivität des Ätherrückstandes entstammten der Carboxylgruppe der IES.

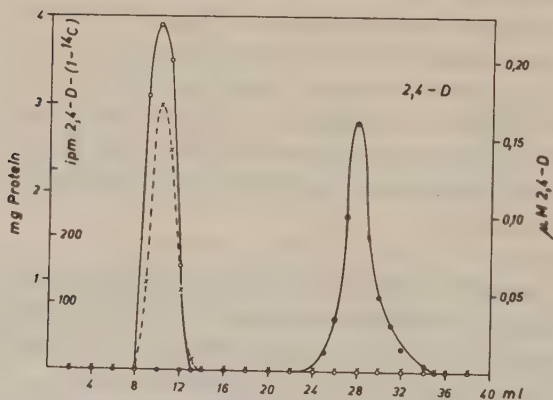
Über die spezifische Aktivität der eingesetzten IES ließ sich errechnen, daß pro mg Protein 0,019 μM IES gebunden wurden. Es muß sich also um einen Komplex zwischen Protein und Auxin handeln, der durch alkalische Hydrolyse, nicht aber durch Dialyse oder Gelfiltration, zerlegt werden kann; dies legt eine echte Bindung zwischen dem Auxinmolekül und dem Protein nahe und spricht gegen eine Absorption des Auxins am Protein.

Auf dieselbe Weise wurde ein Protein-2,4-D-Komplex isoliert (0,0126 μM 2,4-D/mg Protein) Abb. 12/II. Durch Inkubation mit BzS konnte auch ein entsprechender BzS-Komplex erhalten werden (0,023 μM BzS/mg Protein) Abb. 12/III. Da die BzS jedoch kein Wachstoffsstoff ist, und da trotzdem eine Bindung dieser Säure an das Protein stattfindet, ist die physiologische Bedeutung des Auxinproteinkomplexes nicht mehr eindeutig. Es wäre jedoch denkbar, daß die BzS auf dieselbe Weise mit dem Auxinreceptor-Protein reagiert, aber keine Wachstumsauslösung bewirkt; die BzS sollte dann als Antagonist des Auxin-induzierten Wachstums wirken. Entsprechende Versuche liegen noch nicht vor.

I: IES



II: 2,4-D



III: BzS

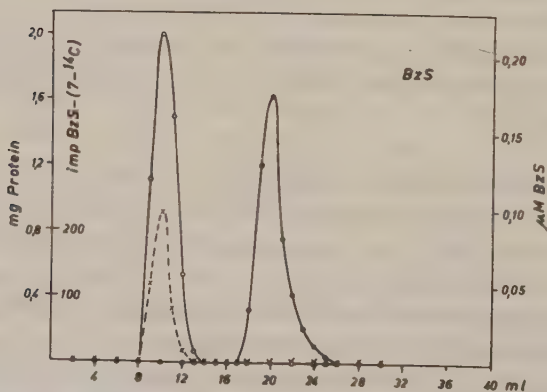


Abb.12: Trennung von Protein und den organischen Säuren: Indol-3-essigsäure (IES) (I), 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) (II) und Benzoessäure (BzS) (III) durch Gelfiltration mittels Sephadex G 25 (nähere Angaben im Text). Die 1 ml Fraktionen wurden auf Protein (o—o), Säuren (●—●) und Radioaktivität (x—x) untersucht.

Nachdem nun die wichtigsten Konjugationsprodukte der IES erkannt waren, sollte vor allem der viel diskutierte katabolische Stoffwechsel des Auxins besonders am lebenden Pflanzenorgan untersucht werden, wobei die Rolle der wachstumssynergistischen und -antagonistischen Phenolcarbonsäuren besondere Beachtung verdienten.

3.2. Oxydative Zerstörung von außen dargebotener Indol-3-essigsäure und der Einfluß verschiedener Phenolcarbonsäuren auf diesen Abbau.

Man findet in der Literatur recht verschiedene Auffassungen über die Wirkungsweise bestimmter natürlich vorkommender Phenolcarbonsäuren auf das Pflanzenwachstum. So stellten VENDRIG und BUFFEL (1961, 1962) fest: "trans caffeic acid may be a very important natural growth regulator, not less important than indole-3-acetic acid." Diese Aussage beruhte auf der Identifizierung von Kaffeesäure als einen der aktiven Wuchsstoffe, die aus Ätherextrakten von Blättern isoliert werden konnten.

Andererseits haben verschiedene Autoren angenommen, daß die Phenolcarbonsäuren lediglich eine Hemmung oder Aktivierung der Indol-3-essigsäure-Peroxydase in vivo bewirken (THIMANN et al. 1962; HENDERSON und NITSCH, 1962), aber selbst nicht als Wuchsstoffe zu betrachten sind. Die IES-Peroxydasen, die wegen der stöchiometrischen Sauerstoffabhängigkeit ihren Namen erhalten hatten, wurden erstmals von TANG und BONNER (1947) beschrieben. Sie sind mit einer Peroxydase gekoppelt und oxydieren IES zu CO und einem kürzlich aufgeklärten Oxydationsprodukt, dem 3²-Methylen-oxindol (HINMAN et al. 1961). GORTNER und KENT (1958) untersuchten eine ganze Reihe Phenolcarbonsäuren auf ihre Fähigkeit, in einem IES-oxydierenden System, das sie aus Ananasgewebe isoliert hatten, als Cofaktoren zu fungieren. RABIN und KLEIN (1957) konnten die hemmende Wirkung von Kaffeesäure auf ein aus etioliierten Erbsen-Epikotylen gewonnenes, IES-oxydierendes Homogenat sichern.

Beide Arbeitsgruppen stellten fest, daß Kaffeesäure und gewisse andere Zimtsäuren einen hemmenden Einfluß auf die IES-Peroxydase *in vitro* ausüben.

BRIGGS et al. (1955) postulierten jedoch, die IES-Peroxydase sei ein Artefakt und werde durch Gewebeerletzungen hervorgerufen: "The enzym system is considered to be active only at cut surfaces and tissue extracts and to be of little importance in the normal growth physiology....". Diese Widersprüche sollten untersucht werden und dabei besonderes Augenmerk auf die Aktivierung bzw. Hemmung der IES-Peroxydase durch Zimtsäuren *in vivo* gelegt werden.

Für die Versuche wurde folgende neue Methodik zur Ermittlung der IES-Peroxydase-Aktivität *in vivo* unter Verwendung von carboxylmarkierter IES entwickelt: das durch die IES-Peroxydase-Aktivität entstehende, aus der Carboxylgruppe der IES entstammende $^{14}\text{CO}_2$ wurde zusammen mit dem Atmungskohlendioxyd in der unter "Material und Methoden" beschriebenen Apparatur in Kaliumhydroxyd aufgefangen und bestimmt. Eine Refixierung des entstandenen CO_2 durch das Gewebe fand nicht statt. Auf diese Weise waren kinetische Messungen der IES-Peroxydase *in vivo* möglich, ohne daß das Gewebe zerstört werden mußte.

Als Pflanzenmaterial dienten 2-2,5 cm lange Avena-Koleoptilen, die ungefähr 2 mm unterhalb des Mesokotyl-Knotens abgeschnitten wurden. Zur Vermeidung des Wundeffektes wurden die Schnittflächen in flüssiges Kollodium eingetaucht und auf diese Weise abgeschlossen. Das trockene Kollodium bildet einen Film um das Gewebe und macht es für Flüssigkeiten undurchlässig.

Abb. 13 zeigt, daß nach dem Einbringen des Gewebes in eine IES-Lösung die Decarboxylierung sofort beginnt; nach einer 2-stündigen "lag period" ist der Verlauf der Decarboxylierungsrate linear. Die intakten Koleoptilen konnten während der Inkubation nur durch die Kutikularabsorption IES aufnehmen,

wobei ein Teil dieses Wuchsstoffs durch ein natürlich vorkommendes IES-Peroxydase-System zerstört wurde. Die IES-Decarboxylierung findet also auch ohne Wundflächen statt, ein Befund, der die in vivo-Existenz der IES-Peroxydase erstmals direkt nachweisen dürfte. Die Untersuchungen des Wundeffekts werden später ausführlich beschrieben.

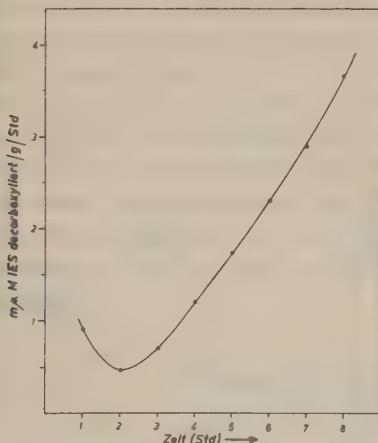


Abb. 13:
Kinetik der Indol-3-essigsäure-(IES)-Decarboxylierung in vivo, mit intakten Avena-Koleoptilen. (Die Wundflächen wurden mit Kollodium verklebt.) Inkubationslösung: 12,5 ml 10^{-5} m IES-(1- 14 C)/g Fgw. 14 CO₂ wurde stündlich gesammelt und die Radioaktivität bestimmt.

In weiteren Versuchen wurde nun die Wirkungsweise bestimmter Phenolcarbonsäuren auf dieses in vivo-System geprüft. Entsprechend dem Mechanismus einer "auxin sparing action" einiger Zimtsäuren müßte durch Zusatz der synergistischen Phenolcarbonsäuren (NITSCH und NITSCH, 1962) eine Hemmung der IES-Decarboxylierung eintreten; ebenso müßte durch Zugabe von Wachstumsantagonisten zur Inkubationslösung eine Steigerung der Aktivität der IES-Peroxydasen festzustellen sein.

Um sichere und vergleichbare Werte zu erzielen, wurden die apikalen 3 mm der etioliierten Avena-Koleoptilen und das Primärblatt entfernt, und nur die 3 folgenden 3,3 mm langen Segmente verwendet. Jede Probe enthielt $1 \text{ g} \pm 2 \text{ mg}$ dieser Segmente. Das Gewebe wurde unter leichtem Schütteln, bei konstanter Temperatur (21°C), im Dunkeln inkubiert und das entstandene CO₂ während 12 Std. jeweils nach 2 Std. als

BaCO₃ gesammelt. Abb. 14 zeigt den Einfluß einiger Phenolcarbonsäuren auf die Decarboxylierung. Während die Wachstoffsynergisten Kaffeesäure, Dihydrokaffeesäure, Sinapinsäure und Chlorogensäure (NITSCH und NITSCH, 1962) tatsächlich die Decarboxylierung hemmen und dadurch die Zerstörung der IES verhindern, konnte bei Zugabe von p-Hydroxybenzoesäure, Isoferula-, Ferulasäure und Phloretinsäure eine Steigerung der in vivo-Zerstörung der IES festgestellt werden.

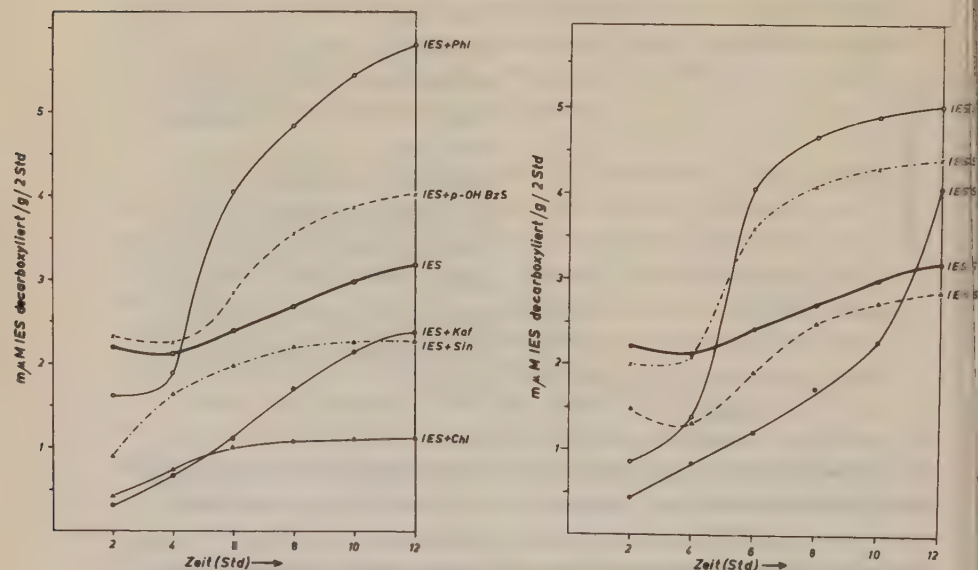


Abb.14:

Einfluß verschiedener Phenolcarbonsäuren auf die Kinetik der IES-Decarboxylierung in vivo. 1 g 3,3 mm lange Avena-Koleoptil-segmente wurden in 12,5 ml 10⁻⁵ m IES-(1-¹⁴C)-Lösung, die 10⁻² m Citrat-Phosphatpuffer pH 5,0 und 10⁻⁴ m Phenolcarbonsäuren enthielt, bei 21°C im Dunkeln inkubiert. In 2-stündigen Intervallen wurde das ¹⁴CO₂ 12 Std. lang gesammelt und die Radioaktivität bestimmt. Chl = Chlorogensäure, Sin = Sinapinsäure, Kaf = Kaffeesäure, p-OH BzS = p-Hydroxybenzoesäure, Phl = Phloretinsäure, Zim = Zimtsäure, Dihydro-Kaf = Dihydrokaffeesäure, Isofer = Isoferulasäure, Fer = Ferulasäure.

GORTNER und KENT (1958) beschrieben p-Cumarsäure als sehr wirkungsvollen Cofaktor der IES-Peroxydase in vitro, während m-Cumarsäure und o-Cumarsäure nur einen geringfügigen Einfluß zeigen; auch von HENDERSON und NITSCH (1962) wurde der stark hemmende Einfluß von p-Cumarsäure auf das IES-induzierte Wachstum festgestellt. Die Wirkungsweise dieser isomeren Cumarsäuren auf die Decarboxylierung der IES bei Avena-Koleoptilen ist in der Abb. 15 dargestellt. Während m- und o-Cumarsäure die Decarboxylierung der IES kaum fördern, hat p-Cumarsäure eine äußerst stimulierende Wirkung auf diese Reaktion. Mit der 5. Stunde beginnt der lineare Zuwachs der Decarboxylierungsgeschwindigkeit der IES. Die Gesamtmenge der unter p-Cumarsäure-Einfluß decarboxylierten IES wächst während des gemessenen Zeitraums von 12 Std. logarithmisch an. Ein solch starker Anstieg der Decarboxylierungsrate konnte mit IES allein im Inkubationsmedium nie beobachtet werden.

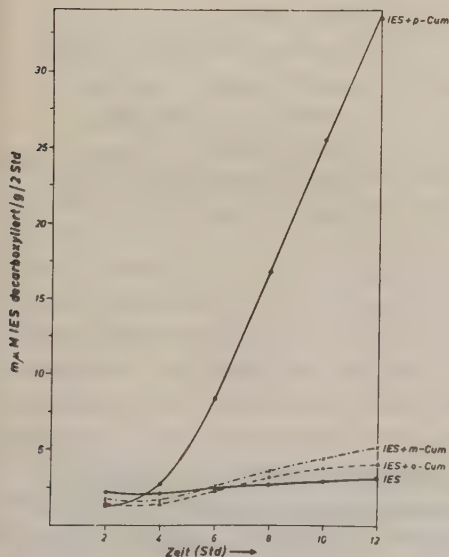


Abb. 15:
Einfluß verschiedener 10^{-4} m Cumarsäure-Isomere auf die Kinetik der IES-Decarboxylierung in vivo. o-Cum = o-Cumarsäure, m-Cum = m-Cumarsäure, p-Cum = p-Cumarsäure. Inkubationsbedingungen wie in Abb. 14.

Bei Betrachtung der Wirkungsweise der *p*-Cumarsäure auf die IES-Peroxydase in vitro und in vivo ist eine Adaptierung des verantwortlichen Enzymsystems, wie dies von GOLDACRE et al. (1953) gefordert wurde, nicht anzunehmen. Denn durch Zugabe von Mn^{++} Ionen bei einer Endkonzentration von 10^{-3} m in der Inkubationslösung steigt die Decarboxylierungsrate im Vergleich zur IES-Kontrolle ohne "lag period" sofort auf 300 % an (Abb. 16). Dies weist eindeutig darauf hin, daß die verantwortlichen Enzymsysteme zwar vorhanden sind, daß aber sie allein nicht mit einer solch hohen Umsatzrate arbeiten. Die Ursache des Anwachsens der Decarboxylierungsgeschwindigkeit nach Zusatz von *p*-Cumarsäure ist jedoch bis jetzt noch ungeklärt.

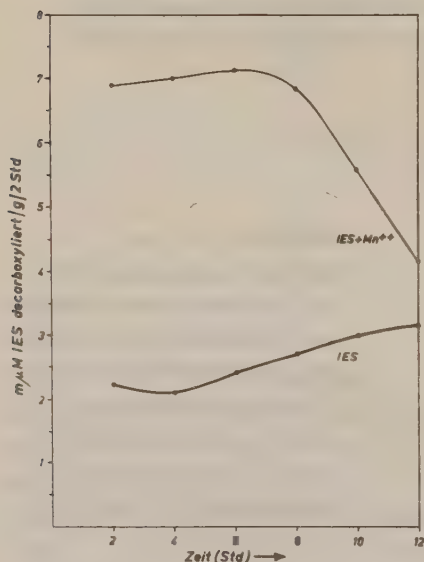


Abb. 16:
Einfluß von Mangan Ionen (10^{-3} m $MnCl_2$) auf die Kinetik der IES-Decarboxylierung in vivo. Inkubationsbedingungen wie in Abb. 14.

Der Einfluß der *p*-Cumarsäure-Konzentration auf die Decarboxylierung der IES während einer 8-stündigen Inkubationsdauer wird in Abb. 17 gezeigt. Bei 10^{-4} m kann ein relativ scharfes Maximum der Zerstörung der IES beobachtet werden. Das Abfallen der Decarboxylierungsrate bei noch höheren Konzen-

trationen hängt mit einer unspezifischen Schädigung des Gewebes zusammen. Es ist bemerkenswert, daß die IES-Zerstörung sowohl in vivo wie in vitro durch die gleiche p-Cumarsäure-Konzentration, 10^{-4} m, maximal gefördert wird.

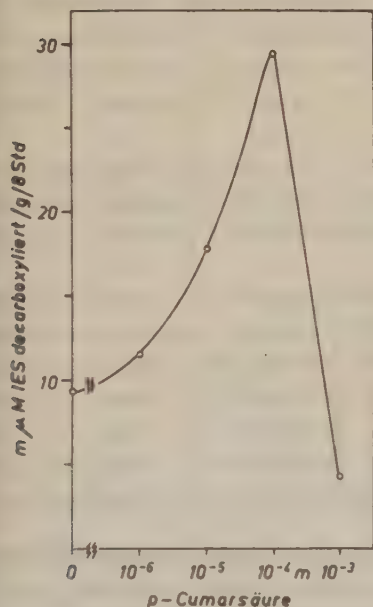


Abb. 17:
Einfluß verschiedener p-Cumarsäure-Konzentrationen auf die IES-Decarboxylierung in vivo. Inkubationsbedingungen wie in Abb.14. Inkubationsdauer 8 Std.

Schließlich wurde der Einfluß verschiedener Phenolcarbonsäuren auf die IES-Peroxydase in vivo während einer 12-stündigen Inkubationszeit, der Wirkung der selben Säuren auf ein zell-freies IES-oxydierendes System in Tab. 5 gegenübergestellt. Nach der Methode von RABIN und KLEIN (1957) wurde aus etioliierten Erbsen-Epikotylen (vgl. 'Material und Methoden') ein Enzymsystem isoliert und die IES-Peroxydase-Aktivität durch Bestimmung des Inkubationsrückstandes mit dem Salkowski-Test berechnet. Bei den Versuchen mit Avena wurde die Menge der in das Gewebe aufgenommenen IES am Ende der 12-stündigen Inkubation nach Extraktion der Koleoptilen mit heißem, 80 % Äthanol gemessen, indem man an einem Aliquot der alkoholischen Lösung die Radioaktivität bestimmte.

IES + verschiedene Phenolcarbonsäuren	IES im Gewebe (mM/g/ 12 h)	IES im Gewebe (% der Kontrolle)	IES decarboxyliert (mM/g/ 12 h)	IES decarboxyliert (% der Kontrolle)	enzymatische Oxydation IES (%)
IES Kontrolle	46,0	100	14,9	100	100
+ Chlorogensäure	52,0	113	5,4	36	77
+ Kaffeesäure	46,0	100	7,9	53	77
+ Dihydrokaffeesäure	41,5	90	10,4	69	83
+ Sinapinsäure	46,2	100	11,2	75	83
+ p-Cumarsäure	32,0	69	90,6	608	181
+ o-Cumarsäure	39,6	86	16,4	110	104
+ m-Cumarsäure	45,3	98	19,5	131	111
+ Phloretinsäure	36,8	80	23,2	155	184
+ p-OH Benzoessäure	37,0	80	18,9	127	112
+ Ferulasäure	45,6	99	21,0	141	124
+ Isoferulasäure	36,7	80	20,4	137	108
+ Zimtsäure	39,9	87	14,1	95	100
+ Tyrosin	40,2	87	14,1	95	100

Tab. 5: Einfluß verschiedener Phenolcarbonsäuren auf die enzymatische Oxydation der Indol-3-essigsäure (IES) in vivo und in vitro, sowie auf die Aufnahme des Auxins in das Gewebe. Inkubationsmedium: 10^{-5} m IES-($1-^{14}\text{C}$), 10^{-2} m Citrat-Phosphatpuffer pH 5,0 und 10^{-4} m die jeweils entsprechende Phenolcarbonsäure. Gesamtvolumen 12,5 ml/g Fgw. Inkubationsdauer 12 Std. Temperatur 21°C (Nähere Angaben über die Inkubationsbedingungen für die enzymatische Oxydation sind unter "Material und Methoden" aufgeführt).

Aus Tab. 5 geht hervor, daß sich bei den getesteten Phenolcarbonsäuren 3 Gruppen unterscheiden lassen. Erstens die auf das Wachstum synergistisch wirkenden Säuren, wie Chlorogensäure, Kaffeesäure, Dihydrokaffeesäure und Sinapinsäure, welche die Decarboxylierung der IES hemmen und ganz deutlich einen "auxin sparing influence" zeigen. Zweitens die wachstumshemmende Phenolcarbonsäuren, wie p-Cumarsäure, Phloretin-, Ferula-, Isoferula-,

m-Cumar und o-Cumarsäure, durch welche die IES-Decarboxylierung verstärkt, der Wachstoffsstoffgehalt des Gewebes herabgesetzt und so das Wachstum verzögert wird. Die dritte Gruppe umfaßt Zimtsäure und Tyrosin, diese Verbindungen beeinflussen weder das Wachstum noch die Decarboxylierung. Charakteristisch für die erste Gruppe der Zimtsäuren ist eine Förderung der IES-Aufnahme durch die Avena-Koleoptilen, dagegen wurde bei p-Cumarsäure inkubiertem Gewebe die geringste IES-Aufnahme gemessen.

Im Gegensatz zu den in vitro-Versuchen von PILET (1957) ließen unsere Messungen in vivo keinen Einfluß der Gibberellinsäure auf die IES-Peroxydase erkennen.

Die Wirkung der verschiedenen Phenolcarbonsäuren auf die Decarboxylierung in vivo läßt sich gut vergleichen mit dem Einfluß dieser Säuren auf die Zerstörung der IES eines aus Erbsen isolierten Enzymsystems in vitro, nur Phloretinsäure bildet dabei eine Ausnahme. Sie erhöht die enzymatische Oxydation in vitro stark, zeigt jedoch in vivo im Vergleich zu p-Cumarsäure nur einen geringen Effekt.

Die von den Avena-Koleoptilen aufgenommenen Phenolcarbonsäuren werden in die entsprechenden Zuckerester umgewandelt, die BIRKOFER et al. (1961) und HARBORN und CORNER (1961) bereits aus verschiedenen Pflanzen isoliert haben. Werden diese Ester auf ihre Beeinflussung der IES-Peroxydase in vitro getestet, so zeigt sich, daß sie durchaus eine hemmende oder fördernde Wirkung auf das Enzym ausüben. Der geringere Einfluß der Dihydroform der Kaffeesäure auf die IES-Oxydase in vivo läßt sich möglicherweise durch eine andersartige Metabolisierung der Dihydroformen gegenüber der ungesättigten Form erklären, wodurch die erstere im Gegensatz zu Kaffeesäure eine geringere Konzentration im Gewebe erreichen könnte.

Im allgemeinen gelten jedoch für die Zimtsäuren dieselben Strukturforderungen für die Beeinflussung des Wachstums wie auch für die der IES-Peroxydase in vivo oder in vitro. Man

kann daher folgern, daß die phenolischen Synergisten und Inhibitoren des Wachstums durch Hemmung oder Aktivierung der IES-oxydierenden Enzym-Systeme wirken.

Nachdem nun der Nachweis erbracht war, daß die IES-Peroxydase in vivo unabhängig von einem Wundreiz wirkt, sollte versucht werden, Aufschluß darüber zu erhalten, inwieweit die Wundflächen von Pflanzenorganen überhaupt einen Einfluß auf die Oxydation der IES ausüben.

3.3. Über den Einfluß der Wundflächen auf die enzymatische Oxydation der Indol-3-essigsäure in vivo.

Es ist seit Jahren bekannt, daß durch die Wirkung auxinzerstörender Enzyme die Ausbeute an Wuchsstoff, die bei der Diffusion durch Schnittstellen oder aus Homogenaten mancher Pflanzen gewonnen werden kann, stark beeinträchtigt wird.

Während die für die IES-Oxydation verantwortlichen Enzyme aus Gewebehomogenaten isoliert (TANG und BONNER, 1947) und in jüngster Zeit auch hochgereinigt werden konnten (MACNICOL und REINERT, 1963), blieb der Einfluß der Wundfläche von Pflanzenorganen auf die Zerstörung des Auxins noch ungeklärt und die Rolle der IES-Peroxydasen in intakten Organen sehr umstritten (RAY, 1958).

REINHOLD (1954) folgerte aus ihren Versuchen, daß die Schnittfläche des Gewebes, wenn überhaupt, dann nur einen geringen Einfluß auf das Verschwinden von Auxin aus dem Medium hat. Dieser Befund konnte durch ANDREAE und van YSSELSTEIN (1960) bestätigt werden. Andererseits postulierten BRIGGS et al. (1955), daß das IES-oxydierende System von *Osmunda* ein durch die Schnittflächen hervorgerufenen Artefakt sei; auch PLATT (1954) stellte fest, daß die IES-Peroxydase-Aktivität, die in Extrakten und Tumorgeweben von *Vitis vinifera* gefunden wurde, wahrscheinlich ein Wundflächen- und Homogenat-Phänomen sein dürfte.

ÅBERG und JÖNSSON (1955) fanden an Erbsenwurzeln, daß durch Erhöhung der Anzahl der Schnittflächen bei gleichbleibendem Frischgewicht entweder die Penetration des Wuchsstoffes in das Gewebe gesteigert wird oder aber die IES-Peroxydase an den Wundflächen stimuliert werden, wodurch ein erhöhter Verlust der aus dem Medium aufgenommenen IES zustande kommt.

Unter Verwendung carboxylmarkierter ^{14}C IES ist der Nachweis gelungen, daß die Oxydation des Auxins auch unabhängig von einer Wundfläche abläuft. Bei Avena kann es sich bei der IES-Peroxydase also keineswegs um ein Artefakt handeln, der durch das Verletzen des Gewebes hervorgerufen wird. Ob jedoch die Wundflächen dennoch einen Einfluß auf die Oxydation haben, wurde nicht untersucht.

Es war daher naheliegend an IES-(1- ^{14}C) zu versuchen, durch Messung der Abhängigkeit der Decarboxylierungsgeschwindigkeit vom relativen Ausmaß der Wundfläche Kenntnis von deren Einfluß auf die IES-Oxydation zu erhalten. Die Messung des durch den enzymatischen Oxydationsprozess aus der IES freigesetzten $^{14}\text{CO}_2$ gestattet einen sehr empfindlichen Nachweis der IES-Zerstörung und erlaubt außerdem, den IES-Umsatz am lebenden Gewebe zu bestimmen.

Als pflanzliches Material wurden 7 Tage alte Helianthus-Keimlinge gewählt. Die etwa 7 cm hohen Pflanzen besitzen ein in seinen oberen 3,5 cm annähernd gleichmäßig dickes Hypokotyl. Sein Durchmesser betrug 2,2 mm. - Aus den Hypokotylen wurden zunächst 2,5 cm lange Zylinder geschnitten und diese dann weiter in kürzere Abschnitte zerlegt, um den relativen Anteil an Wundflächen entsprechend zu variieren; die Summe der Wundflächen (cm^2) wurde stets auf $1 \text{ g} \pm 2 \text{ mg}$ Frischgewicht bezogen

Da zur quantitativen Erfassung des gebildeten $^{14}\text{CO}_2$ der Nachweis der enzymatischen Decarboxylierung unter schwach sauren Bedingungen stattfinden muß, wurden die Versuche bei pH 4,75 durchgeführt. Wie in Kapitel A 1 beschrieben, erfolgt bei diesem pH-Wert die optimale Aufnahme der IES.

In Abb. 18 ist der Zusammenhang zwischen der IES-Oxydation und der Größe der Wundfläche bei gleichem Gewebevolumen dargestellt. Über eine Gesamtwundfläche von $0,88 \text{ cm}^2$ (2,5 cm lange Zylinder) bis zu $13,2 \text{ cm}^2$ (0,165 cm lange Zylinder) pro g Frischgewicht herrscht eine strenge Linearität zwischen der relativen Größe der Wundfläche und dem Maß der IES-Decarboxylierung. Bei Vergrößerung der Wundfläche auf $15 \text{ cm}^2/\text{g}$ Frischgewicht (Zylinderlänge 0,145) setzt sich die Erhöhung der IES-Zerstörung nicht mehr proportional fort, sondern wird etwas geringer, was wahrscheinlich auf eine zu starke Verletzung des gesamten Gewebes zurückzuführen ist. (Die durchschnittliche Länge der Rindenzellen beträgt 0,68 mm, die der Markzellen 1,26 mm)

Die Extrapolation der Reaktionskurve nach der Wundfläche $0,0 \text{ cm}^2$ könnte einen Aufschluß über die IES-Oxydation im intakten, wundflächenfreien Gewebe ergeben; man erhält auf diese Weise einen Decarboxylierungswert von $5,8 \text{ mM IES/g/6 Std.}$ Dieser Wert läßt sich sehr genau durch Verkleben der Wundfläche von 2,5 cm langen Stücken mit einem Kollodiumfilm erreichen, wie dies im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurde. Wie aus Zeile 1 der Tab. 6 hervorgeht, wird also bei einer IES-Konzentration von 10^{-5} M vom intakten Gewebe während 6 Std. etwa $5,8 \text{ }\mu\text{M}$ (= 28 %) der aufgenommenen $20,4 \text{ }\mu\text{M}$ IES decarboxyliert, dagegen gelangen 72 % nicht oxydiert in das Gewebe und können dort metabolisch weiter umgebaut werden (vgl. ZENK, 1963).

Durch Zerteilen der Hypokotyle in 1 mm lange Zylinder läßt sich die durch Decarboxylierung zerstörte IES-Menge auf $18,8 \text{ mM}$ (= 58 %) steigern, d.h., daß durch Vergrößerung der relativen Wundfläche ($22 \text{ cm}^2/\text{g}$) die Aktivität der im intakten Organ vorliegenden IES-Peroxydasen um ca. 200 % gesteigert wird.

Erstaunlich ist (Abb. 18), daß die Menge der aufgenommenen nicht-oxydiert bleibenden IES im Gewebe von 1 cm langen

Hypokotylzylindern ebenso groß zu sein scheint wie in 0,16 cm langen Stücken. Da die Aufnahmekapazität und -geschwindigkeit der IES bei einer Außenkonzentration von 10^{-5} m bei weitem noch nicht gesättigt ist (ANDREAE und van YSSELSTEIN, 1960), muß für diesen Bereich angenommen werden, daß die Aufnahme der IES von der Länge und damit vom Diffusionsweg im Objekt unabhängig ist.

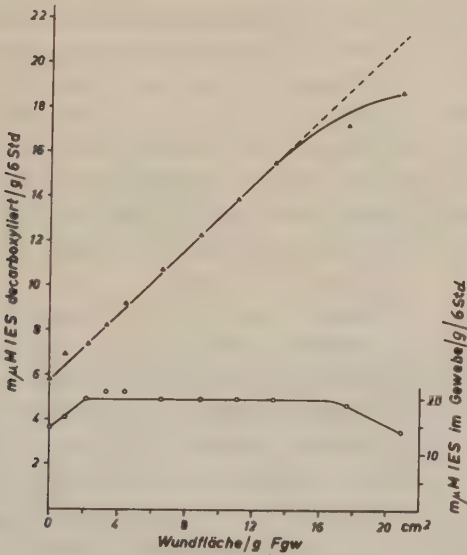


Abb. 18: Indol-3-essigsäure-Decarboxylierung ($\blacktriangle$ — $\blacktriangle$, linke Ordinate) und Aufnahme ($\circ$ — $\circ$, rechte Ordinate) durch *Helianthus*-Hypokotylzylinder mit verschieden großem Wundflächenanteil. Inkubationsmedium: 10^{-5} m IES- ($1-^{14}\text{C}$), 12,5 ml/g Fgw. Anfangs-pH-Wert des Mediums 4,4. Inkubationsdauer 6 Std., Temperatur 21°C.

Nach Befunden von ANDREAE und van YSSELSTEIN (1956) besteht die Möglichkeit, daß die zwei IES-inaktivierenden Prozesse, nämlich die IES-Oxydation und die IES-Konjugierung, in verschiedenen Bereichen des Gewebes vor sich gehen. Die IES-

Decarboxylierung könnte demnach hauptsächlich während der IES-Aufnahme in der Epidermis stattfinden; sobald das Auxin aber das Parenchym erreicht hat, unterliegt es dort mehr den konjugierenden Prozessen (RAY, 1958). Für diese Möglichkeit spricht der histologische Nachweis der besonders starken unspezifischen Peroxydase-Aktivität in der Epidermis (vgl. van FLEET, 1952). Daher wurde der Einfluß der isolierten Epidermis auf die Decarboxylierung der IES untersucht. Die Epidermis der Hypokotyle läßt sich durch vorsichtiges Abziehen nahezu ohne Parenchym erhalten. Aus Tab. 6 ist zu ersehen, daß die abgezogene Epidermis von 1 g Hypokotyl (124 mg) eine erstaunlich hohe Decarboxylierungsaktivität aufweist, die umgerechnet auf 1 g um das 18-fache höher liegt als die des intakten Hypokotylgewebes, wobei die Menge an IES, die unzerstört in das Epidermisgewebe aufgenommen wird, ungefähr mit dem Wert der intakten Hypokotyle auf Frischgewichtsbasis übereinstimmt.

Werden nun Hypokotyle ohne Epidermis mit IES inkubiert, so zeigt sich, daß bei 1 cm langen epidermisfreien Zylindern der Betrag an decarboxylierter IES gleich groß ist wie bei Hypokotylen mit Epidermis, während die im Gewebe befindliche unzerstörte Menge an IES um ca. 50 % höher liegt als im Fall der intakten Hypokotyle. Ähnlich sind die Verhältnisse bei 0,25 cm langen Zylindern, nur ist die Decarboxylierung in diesem Fall ohne Epidermis etwas geringer als bei den entsprechenden Abschnitten mit Epidermis.

Das bedeutet, daß die Epidermis einen wesentlichen kontrollierenden Einfluß auf die Aufnahme ausüben kann, da sie selbst eine recht hohe Decarboxylierungsaktivität besitzt. Der Betrag an IES-Konjugationsprodukten (IES-Asparaginsäure, IES-Glucose) ist in der Epidermis und im Parenchym prozentual derselbe.

Als möglichen Mechanismus der Stimulierung der IES-Oxydation durch Wundflächen könnte man die Freisetzung phenolischer Co-Faktoren der IES-Peroxydasen aus den Vakuolen der angeschnittenen Zellen diskutieren. Diese Phenole müßten dann sofort von den noch unverletzten Zellen resorbiert werden, und auf diese Weise

eine Steigerung der IES-Decarboxylierung bewirken, wie dies auch nach Zusatz gewisser Zimtsäuren beobachtet werden konnte (vgl. das folgende Kapitel).

Zylinderlänge (cm)	Wundfläche (cm ² /g)	Oberfläche (cm ² /g)	IES de- carboxy- liert (mμM/g)	IES-de- carboxy- liert i. % d.in- takten Hypokot.	IES im Gewebe (mμM/g)
* 2,50	0,00	20,0	5,80	100	14,6
2,50	0,88	20,9	6,90	119	16,4
1,00	2,20	22,2	7,40	128	19,7
** 1,00	(22,20)	22,2	7,40	128	29,0
0,75	3,30	23,3	8,35	144	20,9
0,50	4,40	24,4	9,20	159	20,9
0,33	6,60	26,6	10,70	185	19,7
0,25	8,80	28,8	12,25	211	19,7
** 0,25	(28,80)	28,8	9,40	162	28,9
0,20	11,00	31,0	13,90	239	19,7
0,16	13,20	33,2	15,60	270	19,7
0,125	17,60	37,6	17,30	298	18,8
0,10	22,00	42,0	18,80	324	14,0
Epidermis von 1 g					
Hypokotylgewebe (= 124 mg)			13,20	228	2,8
bezogen auf 1 g Epidermis			106,00	1830	22,6

* Wundflächen mit Kollodium verklebt
 ** Hypokotyle ohne Epidermis

Tab.6: Helianthus-annuus: Indol-3-essigsäure-Decarboxylierung und-Aufnahme durch verschieden lange Hypokotylzylinder und durch isolierte Epidermis. Inkubationsbedingungen wie in Abb. 18 (Mittelwerte aus je 3 Bestimmungen).

Mit dem quantitativen Nachweis des Einflusses eines Wundreizes auf die enzymatische Zerstörung der IES enden die Untersuchungen über den Stoffwechsel der BzS, 2,4-D und IES in der Pflanze.

Als Letztes sollte noch die Biosynthese einfach gebauter aromatischer Säuren vom Typus der $C_6 - C_1$ -Säuren betrachtet werden, nachdem nun einige Aufschlüsse über die Aufnahme und den Stoffwechsel, zumindest des einfachsten Typus dieser Säuren, erhalten worden waren.

D. Biosynthese von p-Hydroxybenzoesäure und anderer Benzoesäuren in höheren Pflanzen.

Die Benzoesäuren und ihre oxydierten Derivate sind im Pflanzenreich weit verbreitet (vgl. KARRER, 1958). Über die Biosynthese dieser C_6-C_1 -Körper in der höheren Pflanze ist nur wenig bekannt. Das Hydroxylierungsmuster der natürlich vorkommenden Benzoesäuren läßt jedoch eine biogenetische Verwandtschaft mit den entsprechend hydroxylierten und methoxylierten Phenylpropanen vermuten.

Als wahrscheinlichen Mechanismus für die Biosynthese der Benzoesäuren ist die Entfernung eines C_2 -Körpers der Seitenkette der Phenylpropane durch β -Oxydation denkbar. WAIN und WHIGHTMAN (1954, 1958) konnten das Vorkommen dieses Mechanismus der β -Oxydation auch in der höheren Pflanze durch die Untersuchungen des Abbaues der Indol- und Phenoxy-substituierten Fettsäuren hinreichend begründen; sie konnten zum Beispiel zeigen, daß die entsprechende Propionsäure zur Carboxylsäure abgebaut wird. Derselbe Mechanismus der β -Oxydation von kurzkettigen Phenyl-substituierten Fettsäuren konnte von WEBLEY et al. (1955) bei *Nocardia opaca* nachgewiesen werden; Phenylpropionsäure wurde durch dieses Bakterium zu Benzoesäure abgebaut, wobei sich Zimtsäure eindeutig als Zwischenprodukt erfassen ließ.

Bei Untersuchungen über Alkaloidbiosynthesen konnte nun die wichtige Beobachtung gemacht werden, daß Phenylalanin-(3- ^{14}C) in die C_6-C_1 -Einheit von Lycorin (SUHADOLNIK et al. 1961)

und Belladin (WILDMAN et al. 1962) eingelagert wird. Besonders gut konnten GROSS und SCHÜTTE (1963) den Einbau dieser Aminosäure in die estergebundene Benzoessäurekomponente des Cocains in Erythroxyton zeigen.

Vor dem Abschluß unserer Arbeit erschien eine Veröffentlichung von GRISEBACH und VOLLMER (1963), in der gezeigt wurde, daß bei Verfütterung von Zimtsäure-(3-¹⁴C) an Blätter von *Gaultheria procumbens* in ihnen spezifisch in der Carboxylgruppe markierte Salicylsäure gebildet wird. Die Autoren nahmen dabei ebenfalls den Abbau der Seitenkette der Zimtsäure durch β -Oxydation an. Ob die Hydroxylierung des Phenylringes schon auf der Stufe der Zimtsäure erfolgt oder erst an der möglicherweise aus der Zimtsäure entstandenen Benzoessäure, konnte noch nicht entschieden werden. Daß die höhere Pflanze die Möglichkeit besitzt, Benzoessäure in eine Vielzahl von mono-, di- und auch trihydroxylierten Verbindungen überzuführen, ist bereits erwiesen (IBRAHIM und TOWERS, 1959; KLÄMBT, 1962; ZENK, 1964).

Es war das Ziel der folgenden Untersuchungen, die Biosynthese der C₆-C₁-Körper besonders am Beispiel der p-Hydroxybenzoessäure und einiger anderer Benzoessäuren zu untersuchen.

p-Hydroxybenzoessäure wurde deshalb gewählt, weil sie wohl die am weitesten verbreitete Benzoessäure ist; TOMASZEWSKI (1960) konnte sie bei einer Untersuchung von 122 Gefäßpflanzen in allen 122 Arten nachweisen. Diese Säure tritt außerdem in einigen Pflanzen (*Catalpa*) in sehr hoher Konzentration (50 mg/g Fgw.) auf. Die p-Hydroxybenzoessäure kommt in dieser Pflanze jedoch nicht frei vor, sondern, wie BIRKOFER et al. (1961) zeigen konnten, als 1-p-Hydroxybenzoyl- β -D-glucose-ester.

Während für die Biosynthese der p-Hydroxybenzoessäure in Mikroorganismen ihre direkte Synthese aus Shikimisäure (BASSET und TANENBAUM, 1958) über Chorisminsäure (GIBSON und JACKMAN, 1963) nachgewiesen werden konnte, zogen BOOTH et al. (1960) für die Bildung dieser Säure im Tier den Weg über Tyrosin, p-Cumarsäure zu p-Hydroxybenzoessäure in Erwägung.

1. Einbau verschiedener möglicher Vorläufer in die p-Hydroxybenzoesäure.

Wie unter "Material und Methoden" beschrieben, wurden für die Untersuchungen zur Klärung der Biosynthese der p-Hydroxybenzoesäure in höheren Pflanzen vor allem *Catalpa ovata* und *Catalpa bignonioides* verwendet.

Als mögliche Vorstufen der p-Hydroxybenzoesäure wurden an Blätter von *Catalpa bignonioides* Glucose, Phenylalanin, Tyrosin, p-Cumarsäure und Benzoesäure verfüttert. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß eine 10^{-4} m Lösung der Substanzen durchaus genügte, um einen guten metabolischen Umsatz zu erreichen. Werden drastisch höhere Mengen geboten, läuft man Gefahr, den Stoffwechsel der Pflanze zu sehr zu belasten und Sekundärreaktionen zu induzieren.

In den in Tab. 7 dargestellten Versuchen wurde je 2,5 μ M der markierten Vorstufe pro 2 g Fgw. Blätter appliziert. Eine Ausnahme bildete lediglich p-Cumarsäure, von der 10 μ M/2 g Fgw. geboten werden mußten, weil sie sich nur mit niedriger spezifischer Aktivität gewinnen ließ.

Vergleicht man die Einbauraten der verschiedenen angebotenen Substanzen miteinander, so zeigt sich, daß Tyrosin am besten in p-Hydroxybenzoesäure eingelagert wird; an zweiter Stelle steht Phenylalanin. In beiden Fällen ließ sich auch p-Cumarsäure im Hydrolysat nachweisen. Die Umwandlung von Glucose in die Benzoesäure ist bei dieser und einer zehnfach höheren Konzentration im Außenmedium sehr gering.

Die hohe Konzentration von p-Hydroxybenzoesäure im Gewebe läßt die spezifische Einbaurate sehr niedrig erscheinen, aber auch hier zeigt sich, daß Tyrosin besser als Phenylalanin in diese Benzoesäure umgewandelt wird.

Der relativ geringe Einbau von p-Cumarsäure erklärt sich dadurch, daß ein Großteil der p-Cumarsäure als Glucose-ester

	Glucose- (2- ¹⁴ C)	D,L-Phenyl- alanin- (3- ¹⁴ C)	D,L-Tyro- sin- (3- ¹⁴ C)	p-Cumar- säure- (3- ¹⁴ C)	Benzoe- säure- (7- ¹⁴ C)
aktivität, an- geboten (ipm)	6,30·10 ⁶	10,89·10 ⁶	8,94·10 ⁶	2,0·10 ⁵	5,69·10 ⁶
aktivität, aufgenommen (ipm)	1,91·10 ⁶	3,6 ·10 ⁶	1,58·10 ⁶	1,05·10 ⁵	4,24·10 ⁶
aktivität in Säurefrak- tion (ipm)	6,00·10 ³	3,97·10 ⁵	5,07·10 ⁴	8,0 ·10 ³	1,46·10 ⁶
Gesamtaktivi- tät in p-Hy- droxybenzoe- säure (ipm)	-	1,29·10 ⁴	1,27·10 ⁴	-	2,78·10 ⁴
spezifische aktivität (ipm/mMol)	6,36·10 ²	4,50·10 ⁵	9,30·10 ⁵	3,45·10 ⁴	2,20·10 ⁶
aktivität i. Carboxyl- gruppe d.p- hydroxyben- zoesäure (%)	-	96	-	-	-
Einbaureate* (%)	-	7,16·10 ⁻¹	1,61	-	6,55·10 ⁻¹
spezifische Einbaureate** (%)	2,52·10 ⁻⁵	2,06·10 ⁻²	5,19·10 ⁻²	1,73·10 ⁻¹	9,65·10 ⁻²

b. 7: Einbau verschiedener Vorstufen in p-Hydroxybenzoesäure durch C.bignonioides (p-Cumarsäure: 10 µM/2 g Fgw.; alle übrigen: 2,5 µM/2 g Fgw.

$$* \text{ Einbaureate (\%)} = \frac{\text{Gesamtaktivität im Produkt} \times 100}{\text{Gesamtaktivität des Vorläufers}}$$

$$** \text{ Spezifische Einbaureate (\%)} = \frac{\text{spezifische molare Aktivität des Produkt.} \times 100}{\text{spezifische molare Aktivität des Vorläufers}}$$

festgelegt wird, und auf diese Weise der β-Oxydation entgeht. Doch beweisen der erzielte Einbau und die im Vergleich mit den anderen Vorstufen hohe spezifische Einbaureate die Vorläuferfunktion dieser Zimtsäure in der Biosynthese der p-Hydroxybenzoesäure. Die Rate des Einbaus der Benzoesäure selbst in ihr para-

hydroxyliertes Derivat beträgt etwa 0,7 %. Es handelt sich dabei wohl um ein in Bezug auf die Säurekomponente unspezifisches Enzymsystem, das aber spezifisch nur die Parastellung hydroxyliert. So wird zum Beispiel nicht nur Zimtsäure und Benzoessäure, sondern auch die natürlich nicht vorkommende Phenoxyessigsäure parahydroxyliert.

Das β -C-Atom des Phenylalanins wird zur Carboxylgruppe der p-Hydroxybenzoessäure, wie durch Decarboxylierung und Radioaktivitätsbestimmung ermittelt werden konnte. Der Einbau des Phenylalanins in die p-Hydroxybenzoessäure erfolgt also ohne Veränderung des Kohlenstoffgerüsts der Aminosäure.

Erstaunlich ist die hohe Rate des Einbaus von Tyrosin in die p-Hydroxybenzoessäure, die - wie man annehmen darf - aus p-Cumarsäure entsteht. Diese Tatsache steht im Gegensatz zu der Beobachtung, daß nur Gramineen in der Lage sind Tyrosin in phenolische Zimtsäure umzuwandeln, da den übrigen Dikotylen, wie NEISH (1960) zeigen konnte, das zur Umwandlung nötige Enzym Tyrase zu fehlen scheint.

Es wurde daher versucht, Phenylalanin-Desaminase und Tyrase in einer Acetonpulver-Präparation aus *C. ovata*-Blättern nachzuweisen. Als Test für diese Enzyme wurde die Desaminierung von ^{14}C -markiertem Phenylalanin und Tyrosin (NEISH, 1961; KOUKOL und CONN, 1961) angewandt.

Tab. 8 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. Die Identität der entstandenen Zimtsäuren wurde durch Chromatographie in mehreren Laufmitteln geprüft.

Es konnte somit in *Catalpa* sowohl Phenylalanin-Desaminase als auch Tyrase nachgewiesen werden. Bemerkenswert erscheint das Bildungsverhältnis p-Cumarsäure $\rightarrow$ Zimtsäure = 3,3. Ein so niedriges Verhältnis wurde bisher ausschließlich bei Gräsern gefunden; *Catalpa* scheint die einzige bisher aufgefundene Pflanze außerhalb der Familie der Gramineen zu sein,

die eine derartig hohe Tyrase-Aktivität im Vergleich zur Phenylalanin-desaminase-Aktivität besitzt.

	eingesetzte Menge	Umsatz $\mu\text{M}/\text{Std}/\text{g}$	Verhältnis Zimtsäure/ p-Cumarsäure
Phenylalanin	0,8 μM DL- ^{14}C 19,2 μM L- ^{12}C	1,13	3,3
Tyrosin	0,3 μM DL- ^{14}C 19,7 μM L- ^{12}C	0,34	

Tab. 8: Vergleich der Phenylalanin-desaminase- und Tyrase-Aktivität im Acetonpulver aus *C. ovata*-Blättern. Der Testansatz enthielt: 20 μM der betr. Aminosäure (= 2 μC), 400 μM Boratpuffer pH 8,8, 11,2 mg Protein (entspr. 1 g Acetonpulver). Totalvolumen 5 ml. Temperatur 40°C, Reaktionszeit 3 Stunden. Aufarbeitung des Ansatzes nach NEISH (1961).

Mit Tyrosin als Vorläufer ist für die Biosynthese der p-Hydroxybenzoesäure somit die Schlüsselstellung der p-Cumarsäure erwiesen. Ob jedoch im Falle der Inkubationsversuche mit Phenylalanin der Weg Zimtsäure $\longrightarrow$ p-Cumarsäure $\longrightarrow$ p-Hydroxybenzoesäure eingeschlagen wird, oder aber Zimtsäure $\longrightarrow$ Benzoesäure $\longrightarrow$ p-Hydroxybenzoesäure, ließ sich aus den bisherigen Ergebnissen nicht entscheiden. Es wurde daher versucht, durch kinetische Beobachtung der Einlagerung von Phenylalanin in den organischen Säure-pool der *Catalpa*-Blätter Aufschluß über die Reaktionsfolge zu gewinnen.

2. Kinetische Untersuchungen über die Einlagerung und Umwandlung von Phenylalanin in Blättern von *Catalpa bignonioides*.

Mit Phenylalanin wurden die Versuche hauptsächlich auch deshalb durchgeführt, weil sich in Vorversuchen gezeigt hatte, daß bei Inkubation mit Zimtsäure, dem Desaminierungsprodukt des Phenylalanins, der größte Teil dieser Verbindung als Zinnamoyl-glucose-ester festgelegt und kaum weiter umgebaut wird;

deshalb kommen nur sehr schlechte Einbauraten in die entsprechenden Benzoessäuren zustande. Dagegen wird Phenylalanin, wenn es auch ein recht entferntstehender Vorläufer ist, in manchen Fällen weitaus besser in die entsprechende Verbindung eingebaut. Dies erklärt sich dadurch, daß der geschwindigkeitsbegrenzende Schritt wohl in der Aktivierung der Zimtsäure (über Coenzym-A-Ester) liegt; die aktivierten Zwischenprodukte sind die wahren Vorstufen, während ein Überschuß an zugefügter freier Säure durch Glucosidierung festgelegt wird (vgl. NEISH, 1960).

Um eine möglichst hohe Aufnahme des Vorläufers in das Gewebe zu erzielen, wurde zunächst die Abhängigkeit der Phenylalanin-Aufnahme vom pH-Wert der Inkubationslösung untersucht. Die Aufnahmeexperimente wurden mit einer 10^{-4} m Phenylalanin-(3- 14 C)-Lösung sowohl an ausgestanzten Scheibchen (1,1 cm Durchmesser) von jungen Catalpa ovata-Blättern als auch an 1 cm langen Helianthus-Hypokotyl-Segmenten durchgeführt. Die aufgenommene Aktivität wurde in den Alkoholextrakten der Gewebe bestimmt (vgl. "Material und Methoden") und auf die spezifische Aktivität des verwendeten Phenylalanins (2,5 μ C/ μ M) umgerechnet. Das Ergebnis ist in Abb. 19 dargestellt. Die maximale Aufnahme des Phenylalanins erfolgte durch beide Gewebe bei einem pH-Wert zwischen 5,5 und 6,0. In diesem Bereich liegt der isoelektrische Punkt dieser Aminosäure (5,91). Dieser Befund bestätigt, daß auch Aminosäuren vom lebenden Gewebe am besten im ungeladenen Zustand aufgenommen werden.

In Abb. 20 ist nun der zeitliche Verlauf der D,L-Phenylalanin-(3- 14 C)-Aufnahme in Catalpa bignonioides-Blätter dargestellt. Die Aufnahme des D,L-Phenylalanins in die mit heißem, 80 % Äthanol extrahierbare Fraktion des Blattes (I) erfolgt bis zur 14. Stunde streng linear. Die in dieser Fraktion gefundene Radioaktivität entspricht nach dieser Zeit 0,625 μ M Phenylalanin; davon befinden sich 0,30 μ M in der Säurefraktion des Blattes (II). Eine Verlagerung der Inkubationszeit um weitere 10 Stunden führt zu keiner zusätzlichen Aufnahme des Phenylalanins, jedoch nehmen die Umwandlungsprodukte des Phenylalanins in der Säurefraktion während dieser Zeitspanne um ca. 1/3 ab.

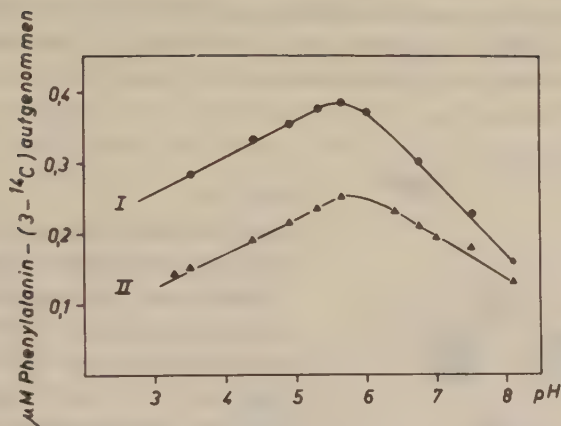


Abb. 19: Einfluß des pH-Wertes der Inkubationslösung auf die Aufnahme von D,L-Phenylalanin in *Catalpa ovata*-Blätter (I) und in *Helianthus*-Hypokotyle (II). Jeweils 2 g Gewebe wurden in 25 ml 10^{-4} m D,L-Phenylalanin-(3-¹⁴C)-Lösung (= 0,5 μc) und 10^{-2} m Citrat-Phosphatpuffer 8 Std. bei 21°C inkubiert.

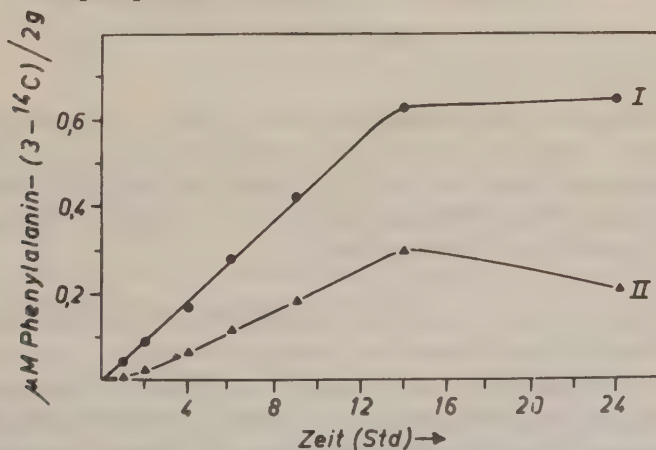


Abb. 20: Kinetik der D,L-Phenylalanin-Aufnahme (I) und Einlagerung (II) in die Säurefraktion durch *Catalpa ovata*-Blätter. 2 g Gewebe wurden in 25 ml 10^{-4} m D,L-Phenylalanin-(3-¹⁴C)-Lösung, die in Bezug auf den Citrat-Phosphatpuffer (pH 5,3) 10^{-2} m war, bei 21°C im Dunkeln inkubiert.

Die chromatographische Analyse der markierten organischen Substanzen im Blatt nach 12-stündiger Inkubation mit Phenylalanin läßt 5 Säuren erkennen, die für etwa 95 % der gesamten Radioaktivität auf dem Chromatogramm verantwortlich sind (Abb. 21).

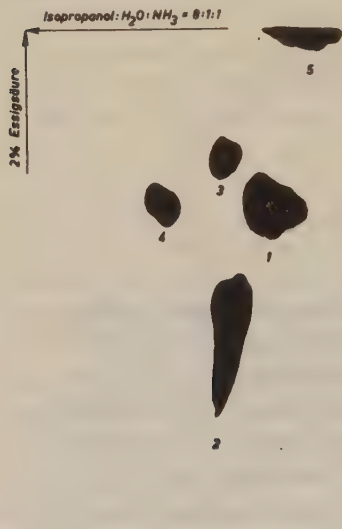


Abb. 21:

Darstellung eines 2 dimensional Autoradiogrammes der organischen Säurefraktion des *Catalpa ovata*-Blattes nach 12-stündiger Inkubation mit D,L-Phenylalanin ($3\text{-}^{14}\text{C}$). Inkubationsbedingungen wie in Abb. 20.

S = Start, 1 = p-Hydroxybenzoesäure, 2 = trans p-Cumarsäure, 3 = cis p-Cumarsäure, 4 = Zimtsäure, 5 = unbekannte Säure Z.

Diese Substanzen konnten identifiziert werden als : p-Hydroxybenzoesäure, cis- und trans-p-Cumarsäure, Zimtsäure und eine noch unbekannte Säure (Z), die mit keiner der üblichen Phenylpropansäuren und auch mit keiner mono-, di- oder trihydroxylierten Benzoesäure identisch ist.

Die Kinetik des Auftretens der Radioaktivität des dargebotenen Phenylalanins in den einzelnen Säuren ist aus Abb. 22 zu ersehen. Besonders fällt das parallele Ansteigen der p-Cumarsäure und p-Hydroxybenzoesäure auf. Wird nach der 14. Stunde kein weiteres Phenylalanin aufgenommen, so bleibt der Betrag an p-Hydroxybenzoesäure auf einem konstanten Niveau. Aber nicht nur diese Säure, sondern auch die einmal gebildete Menge an trans-p-Cumarsäure bleibt konstant. Dieser Befund spricht

nicht dafür, daß die p-Cumarsäure eine Vorstufe der p-Hydroxybenzoesäure ist. Die chromatographische Analyse zeigte jedoch, daß sowohl die gesamte p-Hydroxybenzoesäure als auch die gesamte p-Cumarsäure im Blatt vor der alkalischen Hydrolyse als Glucoseester vorlag. In dieser Form der Bindung an Glucose ist die p-Cumarsäure metabolisch inert und kann nicht weiter umgewandelt werden.

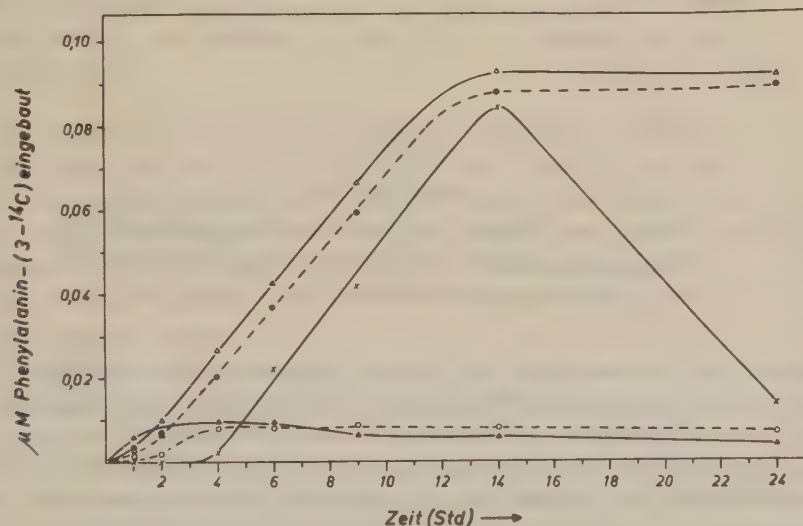


Abb. 22: Kinetik der Bildung von Phenolcarbonsäuren aus D,L-Phenylalanin-(3-¹⁴C). Inkubationsbedingungen wie in Abb. 20. (Δ—Δ) p-Hydroxybenzoesäure, (●—●) trans-p-Cumarsäure, (○—○) cis-p-Cumarsäure, (▲—▲) Zimtsäure, (×—×) unbekannte Säure Z.

In Abb. 23 ist noch der zeitliche Verlauf der Zunahme der spezifischen Aktivität bei p-Cumarsäure (I) und p-Hydroxybenzoesäure (II) während einer 48-stündigen Inkubationsperiode dargestellt.

Zimtsäure und cis-Cumarsäure, die ebenfalls in dem Hydrolysat vorliegen, erreichen ein Maximum in der 4. Stunde; während der

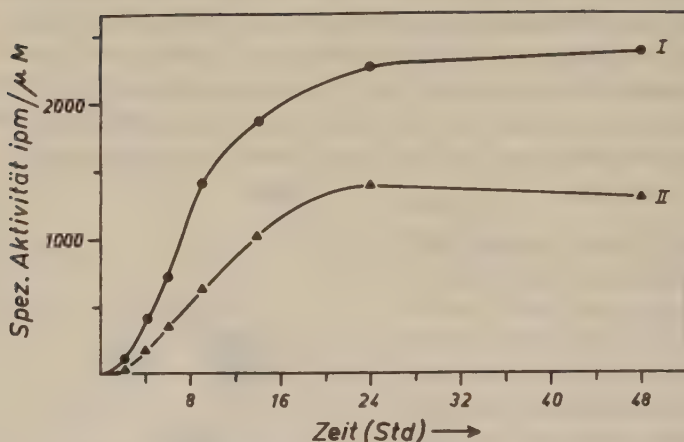


Abb. 23: Kinetik der Zunahme der spezifischen Aktivität in trans-p-Cumarsäure (I) und p-Hydroxybenzoesäure (II). Inkubationsbedingungen wie in Abb. 20.

Betrag an cis-Cumarsäure im Verlauf der nächsten 20 Stunden konstant bleibt, nimmt die Aktivität in der Zimtsäure langsam ab. Da die Inkubation der Blätter im Dunkeln erfolgte und die Aufarbeitung der Extraktion im gedämpften Licht vorgenommen wurde, scheint es unwahrscheinlich, daß es sich bei der cis-p-Cumarsäure um ein Artefakt aus der trans-Cumarsäure durch Bestrahlung handeln kann. Wie oben erwähnt wurde, sinkt, nachdem die Aufnahme des Phenylalanins in das Blatt nach der 14. Stunde beendet war, die Radioaktivität in der Säurefraktion während der folgenden 10 Stunden um ca. 1/3 ab. Dies ist der rapiden Abnahme der Aktivität in der unbekannten Säure Z zuzuschreiben. Die Menge dieser Säure steigt nach einer "lag-phase" von etwa 3 Std. nach Beginn der Phenylalanin-Fütterung parallel mit der p-Cumarsäure an, sie erreicht ein Maximum nach der 14. Stunde und verliert dann, nachdem die weitere Phenylalaninzufuhr unterbrochen ist, rasch an Aktivität. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine rasch durchgesetzte Ligninvorstufe. In Abb. 23 ist die Zunahme der spezifischen Aktivität der p-Cumarsäure (I) und p-Hydroxybenzoesäure (II) aufgezeichnet.

Radioaktive Benzoesäure oder Tyrosin konnten in den Experimenten nach Phenylalanin- ^{14}C -Fütterung weder chromatographisch noch nach Zusetzen inaktiver Trägersäuren und anschließender Rückisolierung der Substanzen gefunden werden.

Somit scheint nun gesichert, daß die Biosynthese von p-Hydroxybenzoesäure aus Phenylalanin und Tyrosin über p-Cumarsäure mit anschließender β -Oxydation der Seitenkette dieser Zimtsäure erfolgt. Die Hydroxylierung erfolgt demnach vor der β -Oxydation.

Wenn es sich hierbei um einen generellen Mechanismus für die Biosynthese von Benzoesäuren handelt, was außer diesen Versuchen auch die Ergebnisse von SCHÜTTE und GROSS (1963) für Benzoesäure und GRISEBACH und VOLLMER (1963) für Salicylsäure vermuten lassen, so sollte Phenylalanin durch die höhere Pflanze auch in Protocatechu-, Vanillin- und Syringasäure eingebaut werden können.

3. Einbau von Phenylalanin in weitere Benzoesäuren.

Die Biosynthese dieser Säuren wurde mit der Trägermethode (vgl. "Material und Methoden") untersucht. Zu den hydrolysierten Alkoholextrakten aus Phenylalanin-(3- ^{14}C)-gefütterten Blättern wurde jeweils eine konstante Menge Benzoe-, Protocatechu-, Vanillin- und Syringasäure zugesetzt; nach der oben beschriebenen Methode wurden die Säuren dann in reiner, kristalliner Form zurückgewonnen. Die spezifische Aktivität wurde an einem Aliquot bestimmt und die Gesamtaktivität der betreffenden Säure im Gesamthydrolysat durch Umrechnung auf den eingesetzten Betrag an Säure ermittelt. Da die endogene Konzentration der Benzoesäuren in den Blättern sehr gering war, wurde sie bei der Berechnung nicht mit berücksichtigt. Die mittels der Trägermethode erzielten Ergebnisse über die Verteilung der Aktivitäten in den Benzoesäuren der Blatthydrolysate stimmten gut mit Werten überein, die mit Hilfe von zweidimensionalen Chromatogrammen und Bestimmungen der prozentualen Aktivitäten erzielt wurden.

	<i>Tsuga canadensis</i>	<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	<i>Populus tremula</i>
Aktivität angeboten (ipm)	$6,0 \cdot 10^6$	$6,0 \cdot 10^6$	$6,0 \cdot 10^6$
Aktivität aufgenommen (ipm)	$3,0 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^6$
Aktivität in der Säurefraktion (ipm)	$6,4 \cdot 10^5$	$6,1 \cdot 10^5$	$5,8 \cdot 10^5$
Gesamtaktivität in Benzoesäure (ipm)	$9,3 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^4$	$5,1 \cdot 10^4$
Aktivität i.d.Carboxylgruppe d.Benzoesäure (%)	93	-	-
Rate des Einbaus in die Benzoesäure (%)	6,2	1,4	4,1
Gesamtaktivität in Protocatechusäure (ipm)	$7,7 \cdot 10^2$	$1,8 \cdot 10^4$	0
Aktivität i.d.Carboxylgruppe d.Protocatechusäure (%)	-	89	-
Rate des Einbaus in die Protocatechusäure (%)	$5,1 \cdot 10^{-2}$	1,2	-
Gesamtaktivität in Vanillinsäure (ipm)	0	$1,2 \cdot 10^3$	$2,1 \cdot 10^4$
Aktivität i.d.Carboxylgruppe d.Vanillinsäure (%)	-	-	96
Rate des Einbaus in die Vanillinsäure (%)	-	$8,3 \cdot 10^{-2}$	1,7
Gesamtaktivität in Syringasäure (ipm)	0	0	0

Tab. 9: Einbau von D,L-Phenylalanin-(3- ^{14}C) ($2,5 \mu\text{M}/2 \text{ g Fgw.}$) in verschiedene Benzoesäuren durch *Tsuga canadensis*, *Vaccinium vitis-idaea* und *Populus tremula*.

Wie aus Tab. 9 hervorgeht, wurde Phenylalanin am besten in die Benzoesäure eingebaut. Wir können somit die von GROSS und SCHÜTTE an Erythroxylen erzielten Ergebnisse auch für andere Pflanzen-

arten bestätigen; die Decarboxylierung der aus Tsuga gewonnenen Benzoesäure zeigte, daß auch hier das β -C-Atom des Phenylalanins zur Carboxylgruppe der Benzoesäure geworden war.

Vaccinium zeigte gute Einlagerungen der Aminosäure in Protocatechusäure. Gleichzeitig konnte die Vorstufe der Protocatechusäure, nämlich Kaffeesäure, ohne Zusatz von Trägermaterial kristallin mit einer spez. Aktivität von $1,4 \cdot 10^6$ (ipm/mM) isoliert werden.

Markierte Vanillinsäure wurde nach Phenylalaninfütterung in Blättern der Zitterpappel gefunden. Auch hier zeigte die Decarboxylierung wie im Falle der Benzoesäure und Protocatechusäure, daß Phenylalanin direkt und ohne Umbau des Kohlenstoffgerüsts in die Benzoesäure eingebaut wird.

In keinem der Fälle (bei 6 untersuchten Pflanzen) ist es jedoch gelungen, nach saurer oder nach alkalischer Hydrolyse radioaktive Syringasäure zu erhalten, obwohl im Falle von Populus auf den Chromatogrammen endogene Syringasäure in Spuren festzustellen war. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß auch die Biosynthese dieser Säure nach dem obigen Schema der β -Oxydation aus Sinapinsäuren verläuft.

DISKUSSION

=====

Die Versuchsergebnisse die bei der Untersuchung der Aufnahme von BzS, 2,4-D und IES durch höhere Pflanzen gewonnen wurden, zeigen, daß die Säuren aus einem gepufferten Medium in das Gewebe absorbiert und dort gespeichert werden. Aus der Wirkung verschiedener Temperaturen und Wasserstoffionen-Konzentrationen auf die Aufnahme läßt sich erkennen, daß daran eher ein chemischer Prozeß als ein rein passiver Diffusionsvorgang beteiligt ist. Die Untersuchungen über den Einfluß des pH-Wertes

der Inkubationslösung auf die Aufnahme der Säuren zeigen weiterhin, daß die maximale Aufnahme bei dem pH-Wert erfolgt, der ungefähr mit dem pK-Wert der Säure übereinstimmt, d.h. wenn 50 % der Säuremoleküle in undissoziierter Form vorliegen. Dies entspricht ganz den theoretischen Überlegungen von SIMON und BEEVERS (1952), die feststellten, daß der Dissoziationsgrad der Säuren im Außenmedium weitgehend für die biologische Wirksamkeit dieser Substanzen verantwortlich ist.

ANDREAE und van YSSELSTEIN (1960) beobachteten einen ähnlichen Einfluß des pH-Wertes auf die Aufnahme von Hetero-Auxin durch Erbsen-Wurzeln in Gegenwart von Calciumionen; bei Erbsen-Epikotylen fanden sie dagegen überraschenderweise keine pH-Abhängigkeit. Bei einer Wiederholung der Versuche konnten wir nun auch für dieses Gewebe eine Abhängigkeit der Aufnahme vom pH-Wert des Mediums feststellen (maximale IES-Aufnahme bei pH 4,7; $pK = 4,75$); Aminosäuren werden am besten bei ihrem isoelektrischen Punkt (IEP) aufgenommen (Abb. 19), dies ließ sich für Phenylalanin (IEP = 5,91) bestätigen, und nach Befunden von WRIGHT (1962) gilt dies auch annähernd für die Aufnahme von Glycin durch Pflanzenwurzeln. Der von ANDREAE und van YSSELSTEIN (1960) und auch von uns beobachtete Abfall der Aufnahmekurve bei pH-Werten die unter dem pK-Wert der Säure liegen, kann noch nicht interpretiert werden; eine Schädigung des Gewebes durch eine zu hohe Wasserstoffionen-Konzentration ist wohl kaum dafür verantwortlich, da die Atmungsintensität in diesem pH-Bereich noch nicht absinkt. Außerdem liegt das Aufnahmemaximum für 2,4-D erst bei pH 3,0, während die relative Aufnahme der IES in diesem Bereich nur noch 40 % des Wertes bei pH 4,75 beträgt.

Die Temperaturabhängigkeit der Aufnahme der Säuren deutet auf eine enzymatische Reaktion hin; es wurden Q_{10} -Werte von 1,40 (IES), 1,42 (2,4-D) und 2,6 (BzS) gemessen. WRIGHT (1962) fand für die Glycin-Aufnahme einen Q_{10} -Wert von 1,7. Diese Werte können als Ausdruck für die Temperaturabhängigkeit der

Permease-Systeme gewertet werden. Es muß sich also bei der Aufnahme um enzymatisch gesteuerte Prozesse handeln und nicht, wie in der älteren Literatur (vgl. ALBAUM et al. 1937; SUTTER, 1944) angenommen wurde, um reine Diffusionsvorgänge.

Die Aufnahmesättigung bei höheren Konzentrationen (3×10^{-2} m), die bei der nicht toxisch wirkenden BzS festgestellt werden konnte, spricht ebenfalls für die enzymatische Steuerung der Aufnahme der Substanzen durch die Zelle. Zu ähnlichen Ergebnissen, die offensichtlich für die Absättigung eines "carrier"-Systems sprechen, kamen WRIGHT (1962) bei Glycin in Konzentrationen über 3×10^{-3} m und BIRT und HIRD (1958) bei Histidin (5×10^{-3}) und Leucin ($2,5 \times 10^{-2}$ m). Die Empfindlichkeit der Aufnahmeprozesse gegen Stoffwechselgifte und gegen die Verminderung der Energiereserven eines Pflanzenorgans durch mehrtägige Verarmung zeigt, daß dieser Transportprozess auch energieabhängig ist (vgl. NIEDERGANG-KAMIEN und LEOPOLD, 1957).

Bei den Aufnahmeprozessen aromatischer Säuren in die Zellen höherer Pflanzen muß also eine ähnliche Mitbeteiligung bisher noch hypothetischer Enzymsysteme vorausgesetzt werden (Permeasen), wie sie für Bakterien von COHEN und MONOD (1957) postuliert wurden.

Ist nun das Säuremolekül in die Zelle gelangt, so unterliegt es verschiedenen anabolischen und katabolischen Reaktionen. Bei dem einfachsten Vertreter der aromatischen Säuren, der BzS, konnten nur anabolische Veränderungen beobachtet werden. Das Molekül wird vorallem mit Glucose, und nach einer "lag phase" von 2 Stunden auch mit Asparaginsäure konjugiert; während dieser Zeit hat sich wahrscheinlich das entsprechende Enzymsystem adaptiv gebildet. (ANDREAE und van YSSELSTEIN, 1960; ZENK, 1961). Diese 2 Hauptmetabolite des Benzoessäurestoffwechsels sind als Entgiftungsprodukte der Pflanze anzusehen. Die entsprechenden Verbindungen, die im Tier nach Benzoessäurefütterung gebildet werden, sind Benzoylglucuronsäure und Hippursäure (bei Insekten auch 1-Benzoyl-Glucose)

Weiterhin wird das BzS-Molekül von der Pflanze auch noch hydroxyliert (vgl. IBRAHIM und TOWERS, 1958), wobei jetzt festgestellt werden konnte, daß die Stellung am Ring, in die die Hydroxylgruppe eingeführt wird, von der Pflanzenspecies abhängig ist. So wird z.B. bei *Catalpa* BzS para-hydroxyliert, während in *Gaultheria* die ortho-Stellung der BzS bevorzugt wird. Eine Decarboxylierung der BzS, wie sie von ANDREAE und GOOD (1957) in einem Umfang bis zu 70 % der aufgenommenen Säure beobachtet wurde, konnte nicht festgestellt werden. Der Betrag an aufgenommener Radioaktivität wurde in den beschriebenen Versuchen in Form von Stoffwechselprodukten der BzS quantitativ zurückgewonnen.

In allen bisher untersuchten Pflanzen (mit Ausnahme von *Vaccinium*) wurde nach der Benzoesäure-Inkubation 1-Benzoyl-Glucose gefunden. Diese Verbindung konnte auf Grund ihrer Instabilität bei sauren pH-Werten und bei höherer Temperatur sowie durch ihre Reaktivität gegenüber neutralem Hydroxylamin identifiziert werden. Die Substanz ist 1958 von QUILICO et al. als Abscheidungsprodukt von Plattiden erstmals in der Natur gefunden worden.

Glucose-6-benzoat, dessen Struktur von BRIGL und ZERRWECK (1934) aufgeklärt wurde, konnte aus *Vaccinium* nach Benzoesäure-Inkubation isoliert werden. Durch den Abbau des Moleküls (Methode modifiziert nach SIMON und STEFFENS (1962)), ließ sich die Stellung der BzS in 6-O-Position der Glucose sichern. Die Überprüfung der Struktur des Glucosebenzoates war notwendig geworden, nachdem PEARL und DARLING (1963) festgestellt hatten, daß die Benzoylgruppe des Tremuloidins (2-O-Benzoyl-Salicin) unter dem Einfluß von basischem Bleiacetat in die 6-O-Stellung wandert, und BRIGL und ZERRWECK (1934) bei der Isolierung des *Vacciniins* aus Preiselbeersaft ebenfalls Bleiacetat verwendet hatten. Charakteristisch für den Stoffwechsel der BzS im Tier und in der Pflanze ist deren Bindung an Kohlehydrate oder Aminosäuren.

Anders liegen die Verhältnisse bei Verfütterung von 2,4-D an Pflanzen; wie bereits ANDREAE und GOOD (1957) beobachtet haben, wird 2,4-D in Erbsen-Epikotylen kaum metabolisiert; es wird nur in Spuren 2,4-D-Asparaginsäure und 2,4-D-Glucose gebildet. Es war nun daran zu denken, daß, wie in Kapitel B.2 hervorgehoben wurde, die sogenannten 2,4-D "resistenten" Pflanzen einen Detoxifizierungsmechanismus für 2,4-D besitzen, während die 2,4-D "sensitiven" Pflanzen keinen Weg haben, das synthetische Auxin metabolisch zu inaktivieren. Diese Hypothese konnte jedoch nach Untersuchung von insgesamt 28 Pflanzen aus beiden Gruppen nicht bestätigt werden.

Die dritte Säure deren Stoffwechselprodukte hier untersucht wurden, war das pflanzliche Streckungswachstumshormon IES. Die Mehrzahl der IES-Metabolite sind schon bekannt (vgl. Kapitel B.3), es wurde deshalb vor allem versucht, die seit langem postulierte Verbindung zwischen Protein und IES zu isolieren. Dieser Komplex wurde schon zu Beginn der 50iger Jahre als die "catalytic entity" bezeichnet, welche die Zellstreckung auslöst (vgl. Kapitel B.3). IES-(1-¹⁴C) wurde an Erbsen-Epikotyle verfüttert; nach 12-stündiger Inkubation wurden die Gewebestücke mazeriert und die Proteine isoliert. Dabei zeigte sich nach Dialyse und Gelfiltration des Proteins, daß $1,9 \times 10^{-11}$ Mol IES pro mg Gesamteiweiß der Zelle gebunden sind, ein Betrag an Auxin, der zur Wachstumsauslösung völlig ausreicht. Die weitere Analyse des Komplexes wurde vorerst zurückgestellt. Versuche mit 2,4-D und BzS zeigten, daß nicht nur Auxine (IES, 2,4-D) sondern auch BzS an Protein gebunden werden, wodurch die Bedeutung des Auxinkomplexes für die Induktion der Zellstreckung nicht mehr eindeutig ist. Es besteht aber die Möglichkeit, daß auch BzS mit dem spezifischen Auxin-Receptor-Molekül reagiert, wobei sie dann aber als Auxin Antagonist wirken müßte. Entsprechende Versuche über den Einfluß der BzS auf das IES-induzierte Wachstum liegen noch nicht vor.

Seit dem Nachweis eines IES-zerstörenden Fermentes durch TANG und BONNER (1947) fanden die IES-Peroxydasen starke Beachtung.

Die Möglichkeit, daß dieses Enzym die Konzentration der IES im Gewebe kontrolliert und so darüber entscheidet, ob ein Pflanzenorgan wächst oder nicht, wurde mehrfach in Erwägung gezogen (vgl. z.B. RAY, 1958).

Allerdings vermuteten REINHOLD (1954), PLATT (1954), BRIGGS et al. (1955) und ANDREAE und van YSSELSTEIN (1960), daß die IES-Peroxydase ein Schnittflächen- und Homogenat-Artefakt sei, dem deshalb keine Bedeutung in der normalen Wachstumsphysiologie eines intakten Pflanzenorgans zukommen könnte.

Unter Verwendung von carboxylmarkierter IES und von Pflanzenorganen, deren Wundflächen mit Kollodium verklebt wurden, ist uns nun der Nachweis gelungen, daß auch in unverletzt erscheinenden Organen eine recht beträchtliche Oxydation der IES stattfindet, die allerdings durch Verwundung des Gewebes noch stimuliert werden kann. GORTNER und KENT (1958) haben eine IES-Peroxydase aus Ananasgewebe isoliert, hochgereinigt und festgestellt, daß das Enzym ein Coenzym benötigt, nämlich p-Cumarsäure. Somit wurde von den genannten Autoren der erste Nachweis des natürlichen Cofaktors der Peroxydasen erbracht, nachdem GOLDACRE et al. (1953) bereits gefunden hatten, daß Phenole, besonders 2,4-Dichlorphenol, die enzymatische Oxydation der IES in vitro beschleunigen.

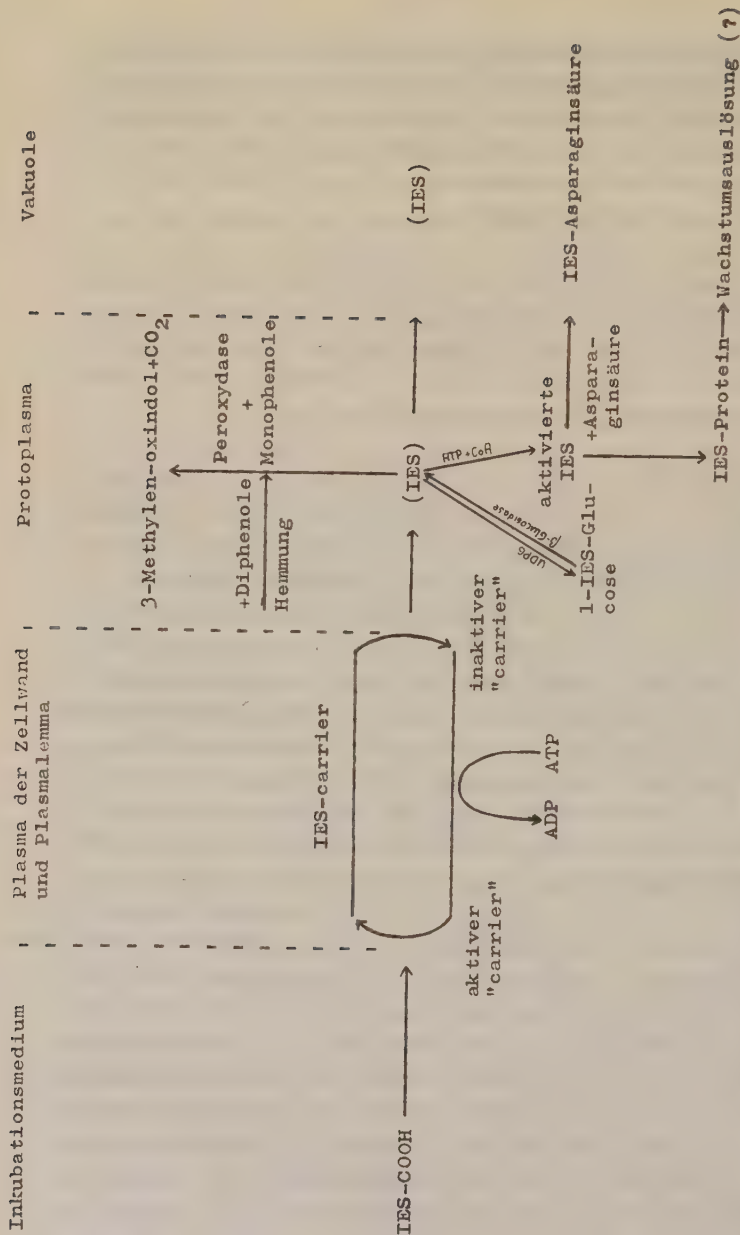
In der Literatur bestehen nun verschiedene Auffassungen über die Wirkungsweise natürlich vorkommender Mono- und Diphenole auf das Pflanzenwachstum. Während VENDRIG und RUFFEL (1961, 1962) vermuten, daß Kaffeesäure ein Auxin sei, weil das Wachstum von Avenakoleoptilen durch Zugabe dieses Diphenols gesteigert wird, behaupten vor allem THIMANN et al. (1962), HENDERSOHN und NITSCH (1962) und FURUYA et al. (1962), daß der Kaffeesäure lediglich ein "auxin sparing influence" zukommt. Nach Anschauung der letzteren Autoren wird die IES-Peroxydase durch Kaffeesäure gehemmt und so die Konzentration der IES im Gewebe erhöht. Diese Kontroverse konnte nun dadurch entschieden werden, daß man dem IES-(1-¹⁴C)-oxydierenden System

verschiedene wachstumshemmende Monophenole und wachstumssteigernde Diphenole zusetzte und danach die Geschwindigkeit der IES-Oxydation beobachtete. Dadurch ließ sich erstmals eindeutig zeigen, daß die phenolischen Synergisten und Antagonisten in vivo durch Hemmung oder Aktivierung des IES-oxydierenden Systems wirken.

Aus den Angaben in der Literatur und den vorliegenden Untersuchungen kann nun zusammenfassend ein Schema (Abb. 24) entworfen werden, welches die Vorgänge bei der Aufnahme und beim Stoffwechsel der aromatischen Säuren am Beispiel des pflanzlichen Wuchshormons IES veranschaulichen soll.

Dem Schema der aktiven Aufnahme der IES durch ein "carrier"-System wurde das von MOTHES und ENGELBRECHT (1961) für aktive Aufnahmephänomene aufgestellte Modell zugrunde gelegt. Dabei geht IES als undissoziiertes Molekül mit einem "carrier" (Permease), der durch ATP aktiviert wird, eine lose Bindung ein, die wieder gelöst wird, sobald das Plasmalemma durchquert ist. Das IES-Molekül kann in das Zellprotoplasma übertreten, und die carrier-Substanz wird in einer energieärmeren und daher inaktiven Form frei. Durch ATP kann die aktive Form des "carriers" wieder regeneriert werden, worauf der Transport von neuem beginnt. Wird die ATP-Produktion durch Dinitrophenol, HF, Arsenat oder durch Einbringen des Gewebes in N_2 -Atmosphäre gestört, so bleibt der Zyklus unterbrochen.

Im Protoplasma kann das IES-Molekül durch verschiedene Reaktionen verändert werden. Es wird z.B. mit UDPG in den Glucose-ester überführt. Diese Inaktivierung ist reversibel, das Molekül wird durch β -Glucosidase leicht gespalten, wie ZENK (1963) in vivo nachweisen konnte. Weiterhin wird das IES-Molekül durch Reaktionen mit ATP und CoA aktiviert (ZENK, 1960) und kann dann entweder mit Asparaginsäure eine irreversible Bindung eingehen, oder es kann mit einem Protein reagieren, dem hier die Rolle des Auxinreceptors zugeschrieben wird.



ADP = Adenosindiphosphat, ATP = Adenosintriphosphat, CoA = Coenzym A,
 IES-COOH = undissoziiertes Indol-3-essigsäure-Molekül,
 UDPG = Uridinphosphatglucose.

Abb.24: Schema der Aufnahme der IES und ihres Stoffwechsels in einer pflanzlichen Zelle.

Da das IES-Molekül vom Protein lediglich durch drastische hydrolytische Bedingungen abgespalten werden kann, muß wohl eine Peptidbindung zwischen Protein und IES vorliegen, deren Biosynthese eine vorausgehende Aktivierung des IES-Moleküls erfordert. Der Überschuß an "aktiviertem" IES könnte dann durch Konjugierung mit Asparaginsäure beseitigt werden. Weiterhin muß angenommen werden, daß das IES-Molekül auch in freier Form in die Vakuole der Zelle abgeschieden werden kann, wie dies von ANDREAE (1963) und ZENK (1963) vermutet wurde. Durch Austausch-Versuche zwischen markierter und nicht markierter 2,4-D und IES konnten die genannten Autoren nachweisen, daß ein geringer Teil des aufgenommenen Auxins in der Zelle vom metabolischen Geschehen ausgeschlossen ist, so als ob es in der Vakuole festgelegt worden wäre.

Ein weiterer wichtiger IES-Inaktivierungsmechanismus besteht in der oxydativen Zerstörung der IES. Das im Plasma vorliegende IES-Molekül kann durch die Peroxydase zu dem von HINMAN et al. (1961) nachgewiesenen Oxydationsprodukt 3-Methyl-Oxindol abgebaut werden, wobei die Carboxylgruppe der IES als CO_2 frei wird. Die enzymatische Oxydation erfordert aber die Gegenwart eines Co-enzym (GORTNER und KENT, 1958) wofür hauptsächlich p-Cumarsäure in Frage kommt. Diese Reaktion wird durch ein erhöhtes Angebot von Diphenolen, vor allem durch Kaffeesäure gehemmt. Der IES-Spiegel in der Zelle wird dadurch erhöht, was sich dann in verstärktem Wachstum ausdrückt. Mittels aller dieser Reaktionen muß es der Zelle möglich sein, die Konzentration des Hormons IES unter Kontrolle zu halten.

Im Schlußteil dieser Arbeit wurde die Biosynthese einiger zell-eigener phenolischer Cofaktoren der IES-Peroxydase untersucht. Besonders wurde die Biosynthese der BzS und ihrer hydroxylierten Derivate studiert, die ja auch bei der enzymatischen Oxydation der IES, in vivo und in vitro aktiv waren.

Durch die Versuche von GROSS und SCHÜTTE (1963) und von GRISEBACH und VOLLMER (1963) ist gezeigt worden, daß Phenylpropane

als Vorstufen für Benzoessäuren in höheren Pflanzen in Frage kommen; die Seitenkette der Phenylpropane wird dabei durch β -Oxydation entfernt. Es konnte jedoch bisher noch nicht geklärt werden, ob die Hydroxylierung, die zu den phenolischen Benzoessäuren führt, schon auf der Stufe des Phenylpropanes oder erst an der Benzoessäure erfolgt.

Durch Verfütterung markierter potentieller Vorstufen konnte nun für den Fall der p-Hydroxybenzoessäure gezeigt werden, daß sowohl nach Phenylalanin- als auch nach Tyrosin-Fütterung markierte p-Cumarsäure auftritt; sie kann deshalb als direkter Vorläufer betrachtet werden.

Die Tatsache, daß trans-p-Cumarsäure und p-Hydroxybenzoessäure in den Catalpa-Blättern gleichzeitig und mit derselben Geschwindigkeit gebildet werden, kann durch zwei um die p-Cumarsäure konkurrierende Reaktionen erklärt werden. Einmal wird die p-Cumarsäure via Coenzym A aktiviert und durch die Reaktionen der β -Oxydation zu p-Hydroxybenzoessäure abgebaut, die ihrerseits in einen Glucoseester umgewandelt wird; zum anderen wird der Überschuß an p-Cumarsäure direkt mit Glucose verestert. Die Reaktionsabläufe sind in Abb. 25 dargestellt.

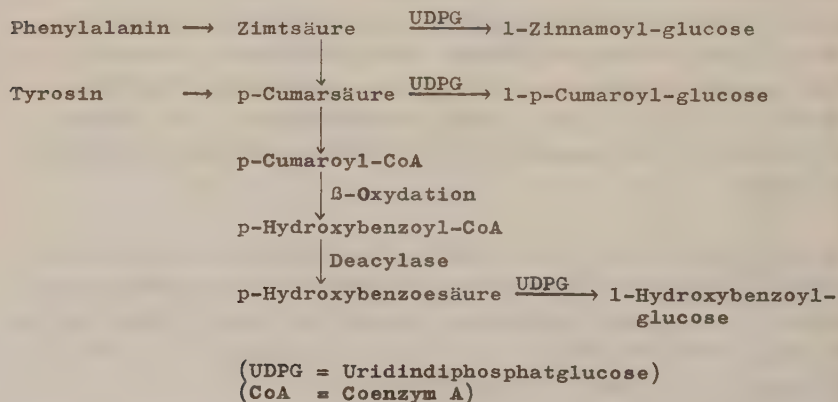


Abb. 25: Schema des Phenylpropanstoffwechsels in *Catalpa ovata*.

Unter den in Kapitel C.2 angeführten experimentellen Bedingungen scheint die Bildungsgeschwindigkeit von p-Cumaroyl-glucose und p-Hydroxybenzoyl-glucose gleich groß zu sein (8 μ M/Std.).

Die 1- β -D-Glucose-ester werden nicht über die CoA-Thioester gebildet, sondern die Synthese erfolgt via Uridindiphosphat-glucose (UDPG), wie sich durch Umsetzung von p-Hydroxybenzoesäure mit UDPG nach der Versuchsmethode von JACOBELLI et al. (1958) beweisen ließ. Das aus der β -Oxydationsspirale austretende p-Hydroxybenzoyl-CoA muß also zunächst deacyliert werden. Eine entsprechende Deacylase konnte unter Verwendung von Benzoyl-CoA als Substrat nachgewiesen werden. Die Ergebnisse von McCALLA und NEISH (1959) und NEISH (1960) haben gezeigt, daß die Zimtsäuren, die als Ligninvorstufen in Frage kommen, von dem einfachsten Vertreter, nämlich Zimtsäure selbst, durch schrittweise Hydroxylierung und Methoxylierung sich in die mehr komplexeren Glieder der Reihe umwandeln lassen. Dabei ließ sich folgende Sequenz durch Applizierung markierter Vorläufer aufstellen: Zimtsäure $\rightarrow$ p-Cumarsäure $\rightarrow$ Kaffeesäure $\rightarrow$ Ferulasäure $\rightarrow$ Sinapinsäure. Die einzelnen Schritte scheinen irreversibel zu sein. Durch Verfütterung von markiertem Phenylalanin ist es nun möglich geworden, auch die entsprechenden hydroxylierten und methoxylierten Benzoesäuren radioaktiv zu erhalten, wobei in zwei Fällen die entsprechende direkte Zimtsäure-Vorstufe ebenfalls gefaßt werden konnte. Daraus ergibt sich ein enger Zusammenhang zwischen den Biosynthesen der Zimtsäure- und der Benzoesäure, wie er in Abb. 26 schematisch dargestellt ist.

Ebenso ist von GRISEBACH und TOLLMER (1963) für die Salicylsäure-Biosynthese der Weg: Zimtsäure $\rightarrow$ o-Hydroxyzimtsäure $\rightarrow$ Salicylsäure in Erwägung gezogen worden. Als möglicher Nebenweg zu dem in Abb. 26 gezeigten Schema wurde von ZENK (1964) für Gallussäure-führende Pflanzen eine weitere Hydroxylierung der Kaffeesäure zu 3,4,5-Trihydroxyzimtsäure und deren anschließende β -Oxydation zu Gallussäure erwogen.

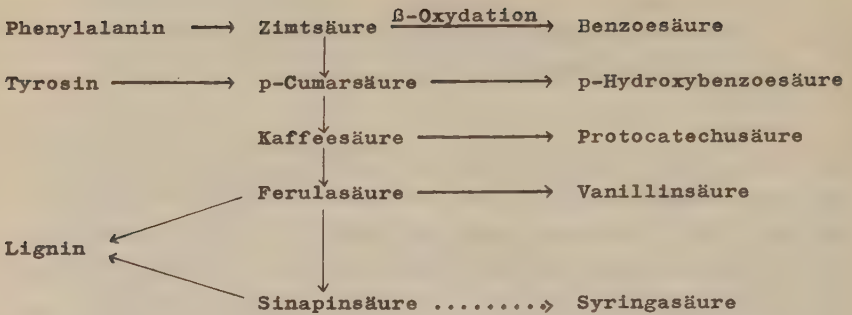


Abb. 26: Zusammenhang zwischen den Biosynthesen der Zimtsäure und der Benzoessäure in der höheren Pflanze.

Den Benzoessäuren könnte möglicherweise eine physiologische Rolle zu Zeiten der Wachstumsruhe dadurch zukommen, daß sie den pool an Zimtsäure-Lignin-Vorstufen vermindern. So haben HÖRHAMMER und SCHERM (1955) gezeigt, daß z.B. Protocatechusäure in *Fagopyrum esculentum* erst in der ausgewachsenen Pflanze in größerer Menge akkumuliert wird, nicht aber während der Hauptwachstumszeit, wo die Zimtsäuren sicherlich zur Lignin-Synthese verwendet werden.

Z U S A M M E N F A S S U N G

=====

A. Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Außenfaktoren auf die Aufnahme von Benzoessäure-(7-¹⁴C) (BzS) durch Spinat-Blätter, von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-(1-¹⁴C) (2,4-D) durch Avena-Koleoptilen und von Indol-3-essigsäure-(1-¹⁴C) (IES) durch *Helianthus*-Hypokotyle führten zu folgenden Ergebnissen :

Bei allen drei Säuren stimmt der pK-Wert der entsprechenden Säure mit dem pH-Wert der maximalen Aufnahme überein.

Zwischen der Aufnahme der Säuren und der Inkubationsdauer herrscht während der ersten 2 Stunden strenge Linearität.

Die Abhängigkeit der Aufnahme der Säuren von der Temperatur folgt einer typischen Optimumfunktion (Maximum bei ca. 21°C).

Der für die Aufnahme verantwortliche Mechanismus wird erst bei Außenkonzentrationen über 10^{-2} m abgesättigt.

Die Aufnahme der Säuren kann durch analog gebaute Säuren und durch gewisse Zellgifte, nicht aber durch Aminosäure, gehemmt werden und ist vom Ernährungszustand des Pflanzenorgans abhängig.

Diese Charakteristiken lassen eine metabolische, aktive Aufnahme der Säuren durch ein gruppen-spezifisches "carrier"-System vermuten.

- B. Glucose-1-benzoat und Glucose-6-benzoat, die Hauptstoffwechselprodukte der BzS in der Pflanze lassen sich auf chromatographischem Weg nicht trennen, sondern nur durch selektive Hydrolyse (1 m H_2SO_4 , 98°C) sowie durch Umsetzen mit neutralem Hydroxylamin. Das Auftreten von Glucose-1-benzoat in der Pflanze konnte zum ersten Mal zuverlässig nachgewiesen werden. Glucose-6-benzoat ließ sich durch Abbau zu Glycol-säure-benzoyl ester identifizieren.

Unter Verwendung eines bereits bekannten Enzymsystems aus Linsen-Keimlingen wurde bewiesen, daß die enzymatische Synthese von Glucose-1-benzoat aus BzS und UDPG erfolgt.

Der Unterschied zwischen 2,4-D "sensitiven" und 2,4-D "resistenten" Pflanzen liegt nicht in der gruppen-spezifischen Ausbildung eines 2,4-D Inaktivierungsmechanismus.

Nach Inkubation von Erbsen mit IES-(1- ^{14}C) gelang es mit Hilfe von Gelfiltration einen seit mehreren Jahren postulierten Komplex zwischen Auxin und Protein einwandfrei nachzuweisen.

Die physiologische Bedeutung dieses Auxin-Proteinkomplexes ist jedoch noch nicht eindeutig erkennbar, da das Konjugat außer bei 2,4-D auch bei dem Nicht-Wuchsstoff BzS gefunden wurde.

Die Existenz der IES-Peroxydasen in vivo konnte mit neuer Methodik unter Einbeziehung von IES-(1- ^{14}C) erstmals nachgewiesen werden. Die Untersuchungen über die Art der Einwirkung bestimmter Phenolcarbonsäuren auf die IES-Peroxydase in vivo und in vitro zeigten eine Aktivierung oder Hemmung der IES-oxydierenden Systeme durch diese phenolischen Antagonisten oder Synergisten des Wachstums.

Das Auftreten von IES-Peroxydasen wird nicht erst durch Wundreize ausgelöst. An *Helianthus*-Hypokotylen konnte allerdings durch eine Vermehrung der Anzahl der Schnittflächen an einem gegebenen Gewebevolumen eine lineare Zunahme der IES-Zerstörung hervorgerufen werden.

- C. Nach Inkubation von *Catalpa ovata*-Blättern mit Glucose-(2- ^{14}C), D,L-Phenylalanin-(3- ^{14}C), D,L-Tyrosin-(3- ^{14}C), p-Cumarsäure-(3- ^{14}C) und Benzoesäure-(7- ^{14}C) wurde gefunden, daß alle diese Substanzen mit Ausnahme der Glucose gut in p-Hydroxybenzoesäure eingebaut werden.

Die kinetischen Versuche mit Phenylalanin-(3- ^{14}C) zeigen, daß p-Hydroxybenzoesäure über p-Cumarsäure nach anschließender β -Oxydation der Seitenkette entsteht. Die Hydroxylierung erfolgt demnach auf der Stufe der Zimtsäure, also noch vor der β -Oxydation.

D,L-Phenylalanin-(3- ^{14}C) wird außer in p-Hydroxybenzoesäure auch in Benzoe-, in Protochatechu- und in Vanillinsäure eingebaut. Die Decarboxylierung der Säuren zeigt, daß das β -C-Atom des Phenylalanins zur Carboxylgruppe der $\text{C}_6\text{-C}_1$ -Säuren geworden ist.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

=====

- ÅBERG, B, u.E.JÖNSSON: Studies on plant growth regulators. XI. Experiments with pea roots, including some observations on the destruction of indoleacetic acid by different types of roots. Kgl. Lantbrukshögskol. Ann. 21, 401-416 (1955).
- ALBAUM, H.G., S.KAISER, u.H.A.NESTLER: The relation of hydrogenion concentration to the penetration of 3-indoleacetic acid into Nitella cells. Amer.Journ.Bot. 24, 513-518 (1937).
- ANDREAE, W.A.: Auxin metabolism and root growth inhibition. Fifth International Conference on Natural Plant Growth Regulators, Gif-sur-Yvette, im Druck 1963.
- ANDREAE, W.A., and N.GOOD: The formation of indoleacetyl-aspartic acid in pea seedlings. Plant Physiol. 30, 380-382 (1955).
- ANDREAE, W.A., and N.E.GOOD: Conjugation with aspartic acid and ammonia as processes in the metabolism of carboxylic acids. Plant Physiol. 32, 566-572 (1957).
- ANDREAE, W.A., and M.W.H. van YSSELSTEIN: Studies on 3-indoleacetic acid metabolism. III. The uptake of 3-indoleacetic acid by pea epikotyls and its conversion to 3-indoleacetylaspatic acid. Plant Physiol. 31, 235-240 (1956).
- ANDREAE, W.A., and M.W.H. van YSSELSTEIN: Studies on 3-indoleacetic acid metabolism. VI. 3-indoleacetic acid uptake and metabolism by pea roots and epicotyls. Plant Physiol. 35, 225-232 (1960).
- ARONOFF, S.: Techniques of radiobiochemistry. Iowa State College Press 1957.
- ASHWELL, G.: Colorimetric analysis of sugars. II. Determination of hexoses arsenmolybdate method of Nelson. In: Methods in Enzymology, III, S.85-86, Academic Press Inc., New York 1957.
- AUDUS, L.J.: Plant growth substances. Plant Science Monographs, London 1959.
- BACH, M.K.: Metabolites of 2,4-dichlorphenoxyacetic acid from bean stems. Plant Physiol. 36, 558-565 (1961).

- BASSET, E.W., u.S.W.TANENBAUM: The general physiology of several strains of *Penicillium patulum*. *Biochim. Biophys.Acta* (Amsterd.) 28, 247-252 (1958).
- BIRKOFER, L., Ch.KAISER, W.NOVERTNE u.U.THOMAS: Natürlich vorkommende Zuckerester von Phenolcarbonsäuren.Z. Naturforschg. 16b, 249-251 (1961).
- BIRT, L.M., and F.J.R. HIRD: The uptake and metabolism of amino acids by slices of carrot. *Biochem.Journ.* 70, 277-286 (1958).
- BLACKMAN, G.E., G.SEN, W.R.BIRCH, and R.G. POWELL: The uptake of growth substances. I. Factors controlling the uptake of phenoxyacetic acids by *Lemna minor*. *J.exp.Bot.* 10, 33-54 (1959).
- BOOTH, A.N., M.S.MASRI, D.J.ROBINS, O.H.EMERSON, F.J.JONES, and F.DeEDS: Urinary phenolic acid metabolites of tyrosine. *J.biol.Chem.* 235, 2649-2652 (1960).
- BRAUNER, L. u.A.BÖCK: Versuche zur Analyse der geotropischen Perzeption.IV. *Planta* (Berl.) 60, 109-130 (1963).
- BRAUNER, L. u.A.HAGER: Versuche zur Analyse der geotropischen Perzeption.I. *Planta* (Berl.) 51, 115-147 (1958).
- BRIGGS, W.R., T.A. STEEVES, I.M. SUSSEX, and R.H. WETMORE: A comparison of auxin destruction by tissue extracts and intact tissue of the fern *Osmunda cinnamomea* L. *Plant Physiol.* 30, 148-155 (1955).
- BRIGL, P., u.W.ZERRWECK: Zur Kenntnis des Vacciniins und anderer Monobenzoyl-glucosen. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 229, 117-124 (1934).
- BROWN, S.A., G.H.N. TOWERS, and D. WRIGHT: Biosynthesis of the coumarins. Tracer studies on coumarin formation in *Hierochloë odorata* and *Melilotus officinalis*. *Can.J.Biochem.Physiol.* 38, 143-156 (1960).
- COHEN, G.N., and J.MONOD: Bacterial permease. *Bact.Review* 21, 169-194 (1957).
- FISCHER, E., u.H.NOTH: Derivate der d-Glucose und d-Fructose. *Chem.Ber.* 51, 321-352 (1918).
- van FLEET, D.S.: Histochemical localisation of enzymes in vascular plants. *Botan.Rev.*18, 354-398 (1952).
- FOSTER, R.J., D.H.McRAE, and J.BONNER: Auxin-induced growth inhibition, a natural consequence of twopoint attachment. *Proc.Nat.Acad.Sci. (Wash.)* 38, 1014-1022 (1952).
- FURUYA, M., A.W.GALSTON, and B.B.STOWE: Isolation from peas of cofactors and inhibitors of indolyl-3-acetic acid oxidase. *Nature* (Lond.) 193, 456-457 (1962).

- GIBSON, F., and L.M.JACKMAN: Structure of chorismic acid, a new intermediate in aromatic biosynthesis. *Nature (Lond.)* 198, 388-389 (1963).
- GOLDACRE, P.L., A.W.GALSTON, and R.L.WEINTRAUB: The effect of substituted phenols on the activity of the indoleacetic acid oxidase of peas. *Arch.Biochem. Biophys.* 43, 358-373 (1953).
- GOMORI, G.: Preparation of buffers for use in enzyme studies. In: *Methods in Enzymology*, I, S. 138-146. Academic Press Inc., New York 1955.
- GORDON, S.A.: Auxin-protein complexes of the wheat grain. *Amer.Jour.Bot.* 33, 160-169 (1946).
- GORTNER, W.A., and M.J.KENT: The coenzyme requirement and enzyme inhibitors of pineapple indole acetic acid oxidase. *J.Biol.Chem.* 233, 731-735 (1958).
- GRIEBEL, C.: Beiträge zur Kenntnis der chemischen Zusammensetzung der Preiselbeeren, Moosbeeren und Kranbeeren. *Z.Unters.d.Nahrungs- u. Genußmittel*, 19, 241-252 (1910).
- GRISEBACH, H., u.K.O.VOLLMER: Untersuchungen zur Biosynthese des Salicylsäuremethylesters in *Gaultheria procumbens* L. *Z.Naturforschg.* 18b, 753-756 (1963).
- GROSS, D., u.H.R.SCHÜTTE: Phenylalanin als Vorstufe von Tropasäure und Benzoesäure. *Arch. Pharm.* 296, 1-6 (1963).
- HANSCH, C., R.MUIR, and R.METZENBERG: Further evidence for a chemical reaction between plant growth-regulators and a plant substrate. *Plant Physiol.* 26, 812-821 (1951).
- HARBORNE, J.B., and J.J.CORNER: Further studies of the metabolism of cinnamic acids in higher plants. *Biochem.J.* 80, 7 p. (1961).
- HENDERSON, J.H.M., and J.P.NITSCH: Effect of certain phenolic acids on the elongation of *avena* first internodes in the presence of auxins and tryptophan. *Nature (Lond.)* 195, 780-782 (1962).
- HINMAN, R.L., C.BAUMAN, and J.LANG: The conversion of indol-3-acetic acid to 3-methylene oxindole in the presence of peroxidase. *Biochim.Biophys.Res.Com.* 5, 250-254 (1961).
- HÖRHAMMER, L., u.A.SCHERM: Über das Vorkommen zyklischer Pflanzensäuren bei einigen Polygonaceen und Betulaceen. *Arch.Pharm.* 288/60, 441-447 (1955).

- IBRAHIM, R.K., and G.H.N. TOWERS: Conversion of salicylic acid to gentisic acid and o-pyrocatechuic acid, all labelled with carbon-14 in plants. *Nature (Lond.)* 184, 1803 (1959).
- IBRAHIM, R.K., and G.H.N. TOWERS: The identification by chromatography of plant phenolic acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 87, 125-128 (1960).
- JACOBELLI, G., M.J. TABONE, et D. TABONE: La synthèse enzymatique de l'ester β glucosidique de l'acide anthranilique: ses relations avec les processus de synthèse et de dégradation de l'uridine diphosphate glucose. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 40, 955-963 (1958).
- JAROWSKI, E.G., and J.S. BUTTS: Studies in plant metabolism. V: The metabolism of C^{14} -labelled 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in bean plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 38, 207-218 (1952).
- JOHNSON, M.P., and J. BONNER: The uptake of auxin by plant tissue. *Physiol. Plantarum (Copenh.)* 2, 102-118 (1956).
- JONES, M.E., and F. LIPMANN: Aceto-CoA-Kinase. In: *Methods in Enzymology*, I, S.587, Academic Press Inc., New York 1955.
- KARRER, W.: *Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe*. Birkhäuser Verlag, Basel 1958.
- KLÄMBT, H.D.: Conversion in plants of benzoic acid to salicylic acid and its β D-glucoside. *Nature (Lond.)* 196, 491 (1962).
- KLÄMBT, H.D.: Stoffwechselprodukte der Indol-3-essigsäure und der Benzoesäure. *Planta (Berl.)* 56, 618-631 (1961).
- KOUKOL, J., and E.E. CONN: Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J. biol. Chem.* 236, 2692-2698 (1961).
- LAYNE, E.: Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: *Methods in Enzymology* III, S.447, Academic Press Inc., New York 1957.
- MACNICOL, P.K., u. J. REINERT: Untersuchungen über Auxinoxidasen. II. Auftrennung und IES-Oxydaseaktivität der multiplen Peroxydase des etiolierten Erbsensprosses. *Z. Naturforsch.* 18b, 572-579 (1963).
- MCCALLA, D.R., and A.C. NEISH: Metabolism of phenylpropanoid compounds in *Salvia*. II. Biosynthesis of phenolic cinnamic acids. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 537-547 (1959).

- MOTHES, K., and L. ENGELBRECHT: Kinetin-induced directed transport of substances in excised leaves in the dark. *Phytochem.* 1, 58-62 (1961).
- NEISH, A.C.: Biosynthetic pathways of aromatic compounds. *Ann.Rev.Plant Physiol.* 11, 55-80 (1960).
- NEISH, A.C.: Formation of m- and p-coumaric acids by enzymatic deamination of the corresponding isomers of tyrosine. *Phytochem.* 1, 1-24 (1961).
- NIEDERGANG-KAMIEN, E., and A.C.LEOPOLD: Inhibitors of polar auxin transport. *Physiol. Plantarum* (Copenh.) 10, 29-38 (1957).
- NITSCH, J.P., et C.NITSCH: Composés phénoliques et croissance végétale. *Annales Physiol. Veg.* 4, 211-223 (1962).
- PEARL, I.A., and S.F.DARLING: Studies on the leaves of family Salicaceae. III. Migration of acyl groups during isolation of glucosides from *Populus grandidentata* leaves. *Arch.Biochem.Biophys.* 102, 33-38 (1963).
- PILET, P.-E.: Action des gibberellines sur l'activité auxines-oxydasique de tissus cultivés in vitro. *C.r.Acad.Sci. (Paris)* 245, 1327-1328 (1957).
- PILET, P.-E.: In vitro destruction of auxin labeled with C¹⁴. *Physiol.Plantarum* (Copenh.) 13, 766-775 (1960).
- PLATT, R.S.: The inactivation of auxin in normal and tumorous tissues. *Ann.biologiques* (Copenh.) 30, 349-355 (1954).
- QUILICO, A., F.PIOZZI, M.PAVAN and E.MANTICA: The structure of periplanetin. *Tetrahedron* 5, 10-14 (1959).
- RABIN, R.S., and R.M.KLEIN: Chlorogenic acid as a competitive inhibitor of indoleacetic acid oxidase. *Arch. Biochem.Biophys.* 70, 11-15 (1957).
- RAY, P.M.: Destruction of auxin. *Ann.Rev.Plant Physiol.* 9, 81-118 (1958).
- REINHOLD, L.: The uptake of indole-3-acetic acid by pea epicotyl segments and carrot discs. *New Phytologist* 52, 217-239 (1954).
- SIEGEL, S.M., and A.W.GALSTON: Experimental coupling of indole-acetic acid to pea root protein in vivo and in vitro. *Proc.Nat.Acad.Sci. (Wash.)* 39, 1111-1118 (1953).

- SIMON, E.W., and H.BEEVERS: The effect of pH on the biological activities of weak acids and bases. I. The most usual relationship between pH and activity. *New Phytologist* 51, 163-190 (1952).
- SIMON, H., u.J.STEFFENS: Abbauprozess zur Ermittlung der ¹⁴C-Verteilung in Pentosen und Hexosen. *Chem.Ber.* 95, 358-370 (1962).
- STAHL, E.: *Dünnschicht-Chromatographie*. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962.
- STUTZ, R.E., and R.H. BURRIS: Photosynthesis and metabolism of organic acid in higher plants. *Plant Physiol.* 26, 226-243 (1951).
- SUHADOLNIK, R.J., A.G.FISCHER, and J.ZULALIAN: The biogenetic origin of the C₆-C₁ unit of lycorine. *J.Amer. Chem.Soc.* 84, 4348-4349 (1962).
- SUTTER, E.: Die chemische Bestimmung des Heteroauxins und Versuche über seine Aufnahme durch die Pflanze. *Ber.d.Schweiz.Bot.Ges.* 54, 197-244 (1944).
- TABONE, D., et J.TABONE: L'uridine diphosphate glucose facteur de la synthèse de l'ester glucosidique de l'acide anthranilique. *C.r.Acad.Sci. (Paris)* 242, 302-303 (1956).
- TABONE, J.: La bioesterification du glucose: Etude sur l'inhibition de la synthèse de l'ester β-glucosidique de l'acide anthranilique. *C.r.Acad.Sci. (Paris)* 247, 2219-2221 (1958).
- TANG, Y.W., and J.BONNER: The enzymatic inactivation of indole-acetic acid. I. Some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.* 13, 11-25 (1947).
- THESING, J.u.F.SCHULDE: Notiz über die präparative Darstellung von Heteroauxin und Tryptamin. *Chem.Ber.* 85, 324 (1952).
- THIMANN, K.V., M.TOMASZEWSKI, and W.L.PORTER: Growth-promoting activity of caffeic acid. *Nature (Lond.)* 193, 1203 (1962).
- TOMASZEWSKI, M.: The occurrence of p-hydroxybenzoic acid and some other simple phenols in vascular plants. *Bull.Acad.Polon.Sci. Cl.II.* VIII, 61-65 (1960).
- VENDRIG, J.C., and K.BUFFEL: Growth-stimulating activity of trans-caffeic acid isolated from *Coleus Rhenaltinus*. *Nature (Lond.)* 192, 276-277 (1961).

- VENDRIG, J.C., and K.BUFFEL: Growth-promoting activity of caffeic acid. *Nature (Lond.)* 193, 1204 (1962).
- WAIN, R.L.: The chemical regulation of plant growth. *Agricultural Progress* XXX, 81-89 (1955).
- WAIN, R.L. and F.WIGHTMAN: The growth-regulating activity of certain ω -substituted alkyl carboxylic acids in relation to their β -oxidation within the plant. *Proc.Royal Soc. B.* 142, 525-536 (1954).
- WAIN, R.L., and F.WIGHTMAN: Beta-oxidation of ω -(3-indolyl) alkanecarboxylic acids in plant tissues. *Nature (Lond.)* 181, 1387-1389 (1958).
- WEBLEY, D.M., R.B.DUFF, and V.C.FARMER: Beta-oxidation of fatty acids by *Nocardia opaca*. *J.gen.Microbiol.* 13, 361-369 (1955).
- WEDDING, R.T., and G.E.BLACKMAN: The uptake of growth substances. III. Influence of indoleacetic acid and other auxins on the uptake of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by *Chlorella*. *J.exp. Bot.* 12, 378-389 (1961).
- WEINTRAUB, R.L., J.N.YEATMAN, J.A. LOCKHART, J.H.REINHART, and M.FIELDS: Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. II. Metabolism of the side chain by bean plants. *Arch.Biochem.Biophys.* 40, 227-285 (1952).
- WILDMAN, G.S., and S.GORDON: The release of auxin from isolated leaf proteins of spinach by enzymes. *Proc.Nat. Acad.Sci.* 28, 217-228 (1942).
- WILDMAN, W.C., A.R.BATTERSBY, and S.W.BREUER: Biosynthesis in the Amarylidaceae. Incorporation of 3-C¹⁴ tyrosine and phenylalanine in Nerine Bowdenii W.Wats. *J. Amer.Chem.Soc.* 84, 4599-4600 (1962).
- WRIGHT, D.E.: Amino acid uptake by plant roots. *Arch.Biochem. Biophys.* 97, 174-180 (1962).
- ZABIN, I., A.KEPES, and J.MONOD: Thiogalactoside transacetylase. *Journ.Biol.Chemistry* 237, 253-257 (1962).
- ZERVAS, L.: Über Benzyliden-glucose und ihre Verwendung zu Synthesen: 1-Benzoyl-glucose. *Ber.dtsch.chem.Ges.* 64, 2289-2296 (1931).
- ZENK, M.H.: Untersuchungen über den Auxinstoffwechsel, mit besonderer Berücksichtigung von Indol-3-essigsäure. *Diss.Universität München* 1959.
- ZENK, M.H.: Enzymatische Aktivierung von Auxinen und ihre Konjugierung mit Glycin. *Z.Naturforschg.* 15b, 436-441 (1960).

- ZENK, M.H.: Aufnahme und Stoffwechsel von α -Naphthyl-Essigsäure durch Erbsenepikotyle. *Planta* (Berl.) 58, 75-94 (1962).
- ZENK, M.H.: Zur Frage der Stoffwechselprodukte der Benzoesäure in höheren Pflanzen. *Planta* (Berl.) 58, 668-672 (1962).
- ZENK, M.H.: Isolation, biosynthesis and function of indole-acetic acid conjugates. Fifth International Conference on Natural Plant Growth Regulators, Gif-sur-Yvette, im Druck, 1963.
- ZENK, M.H.: Über Primäreffekte der phototropischen Perzeption. Habilitationsschrift, München (1963).
- ZENK, M.H.: Zur Frage der Biosynthese der Gallussäure in höheren Pflanzen. *Z.Naturforschg.* 19b, 83-84 (1964).
- ZENK, M.H., und H.SCHERF: D-Tryptophan in höheren Pflanzen. *Biochim.Biophys. Acta* (Amsterd.) 71, 737-738 (1963).
- ZINNER, H., K.WESSELY, W. BOCK, K. RIECKHOFF, F. STRANDT, und W. NIMMICH: Benzoate und p-Nitrobenzoate von Aldosen und Aldosemercaptalen. *Chem.Ber.* 90, 500-515 (1957).

Herrn Professor Dr. L. Brauner danke ich
sehr herzlich für seine liebenswürdige Bera-
tung und Hilfe. Herr Privatdozent Dr. M.H.
Zenk überließ mir freundlicherweise das
Thema und förderte den Fortgang der Arbeit
außerordentlich durch seine ständig rege
Anteilnahme und durch viele Ratschläge.
Dafür möchte ich ihm an dieser Stelle be-
sonders danken.

Die Arbeit wurde durch Sachbeihilfe der
Deutschen Forschungsgemeinschaft an Herrn
Privatdozent Dr.M.H. Zenk unterstützt.

Lebenslauf

=====

Am 4. April 1938 wurde ich, Gisela Müller, als Tochter des Kaufmanns Willy Müller und seiner Ehefrau Ruth, geb. Ade, in Tübingen geboren.

Von 1944-1948 besuchte ich die Volksschule in Reutlingen; 1948 trat ich dort in die Oberrealschule ein und legte 1957 an dieser Schule die Reifeprüfung ab. 1957 begann ich an der Universität Tübingen mit dem Biologiestudium. Im Wintersemester 1958/59 immatrikulierte ich mich an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München und arbeitete seit Sommer 1961 an der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Herrn Professor Dr.L. Brauner und Herrn Privatdozent Dr.M.H. Zenk.

